

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv modulátorů hladin oxidu dusnatého  
na produkci antimikrobiálních peptidů  
u včely medonosné (*Apis mellifera*)**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Anna Bartáková</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Martina Janků</b>
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

.....  
Podpis studenta

Tímto bych ráda poděkovala paní Mgr. Martině Janků za vstřícnost, ochotu, trpělivost, čas a věcné připomínky týkající se řešené problematiky. Ráda bych také poděkovala Katedře biochemie za vstřícný přístup během řešení praktické části mé bakalářské práce.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Anna Bartáková
Název práce	Vliv modulátorů hladin oxidu dusnatého na produkci antimikrobiálních peptidů u včely medonosné ( <i>Apis mellifera</i> )
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Martina Janků
Rok obhajoby práce	2022

### Abstrakt

V teoretické části této bakalářské práce jsou shrnuty poznatky o funkcích oxidu dusnatého (NO) u obratlovců a bezobratlých v zaměření na funkci NO v imunitním systému hmyzu a včely medonosné (*Apis mellifera*). NO je důležitou signální molekulou v živých organismech. Součástí humorální imunity *A. mellifera* je produkce antimikrobiálních peptidů (AMP). U některých druhů hmyzu bylo popsáno, že produkce AMP je ovlivňována hladinami NO, u včely však tento vztah mezi AMP a NO doposud studován nebyl.

V experimentální části této práce byl proveden pilotní experiment se včelami krmenými potravou obohacenou o modulátory hladin NO a podrobenými imunizaci lipopolysacharidy z *Escherichia coli*, která produkci AMP u včel stimuluje. U studovaných včel byly stanoveny hladiny zásobních forem NO, S-nitrosothiolů, Savillovou metodou a dále hladiny vybraných AMP (abaecin, defensin-1, hymenoptaecin) nepřímou ELISA metodou. V práci byl v rámci tohoto pilotního experimentu potvrzen účinek imunizace na tvorbu včelích AMP, avšak vliv modulátorů hladiny NO ve zvolených koncentracích na jejich produkci byl zanedbatelný.

Klíčová slova	<i>Apis mellifera</i> , oxid dusnatý, NOSynthasa, antimikrobiální peptidy, S-nitrosothioly
Počet stran	53
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Anna Bartáková
Title	Effects of modulators of nitric oxide levels on the production of antimicrobial peptides in honey bee ( <i>Apis mellifera</i> )
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Martina Janků
The year of presentation	2022

### Abstract

The theoretical part of the bachelor thesis summarizes the knowledge about the functions of nitric oxide (NO) in vertebrates and invertebrates, focusing on the role of the NO in the immune system of insects and honey bees (*Apis mellifera*). NO is an important signalling molecule in living organisms. The production of antimicrobial peptides (AMP) is part of the humoral immunity of *A. mellifera*. In some insect species, AMP production is affected by NO levels; however, in bees this relationship between AMP and NO has not been studied so far.

In the experimental part of this work, a pilot experiment was performed with bees fed a diet enriched with modulators of NO levels and then immunized with lipopolysaccharide from *Escherichia coli*, which stimulates AMP production in bees. The levels of NO storage forms, S-nitrosothiols, in the studied bees were determined by the Savill method and the levels of selected AMPs (abaecin, defensin-1, hymenoptaecin) were analyzed by the indirect ELISA method. The effect of immunization on the production of bee AMPs was confirmed in this pilot experiment, but the effect of modulators of NO levels at selected concentrations on their production was not significant.

Keywords	<i>Apis mellifera</i> , nitric acid, NO synthase, antimicrobial peptides, S-nitrosothiols
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Czech

## **OBSAH**

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>3</b>
2.1	NO a RNS v živých organismech.....	3
2.1.1	Funkce NO u člověka a savců.....	4
2.2	Funkce NO u bezobratlých.....	7
2.2.1	Obecné funkce NO .....	7
2.3	Funkce NO u včely medonosné.....	12
2.3.1	Obecné funkce.....	12
2.3.2	Funkce NO v imunitě včely medonosné .....	12
2.4	Metabolismus NO.....	13
2.4.1	S-nitrosothioly.....	13
2.4.2	Nitrované proteiny .....	16
2.4.3	Dusitany a dusičnany .....	16
2.5	Imunitní systém včely medonosné .....	16
2.6	Antimikrobiální peptidy včely medonosné .....	18
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>20</b>
3.1	Materiál a přístroje .....	20
3.1.1	Chemikálie .....	20
3.1.2	Přístroje a vybavení.....	21
3.1.3	Biologický materiál.....	22
3.2	Metody.....	22
3.2.1	Příprava vzorků včel .....	22
3.2.2	Stanovení hladiny S-nitrosothiolů Savillovou metodou .....	24
3.2.3	Stanovení hladiny vybraných AMP (Aba, Hym, Def-1) nepřímou ELISA metodou.....	27

<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>30</b>
4.1	Stanovení proteinů Bradfordovou metodou .....	30
4.2	Stanovení hladiny RSNO Savillovou metodou .....	31
4.3	Stanovení hladiny vybraných AMP nepřímou ELISA metodou.....	36
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>LILTERATURA .....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>51</b>

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část**

Zpracování literární rešerše shrnující:

- obecnou charakteristiku oxidu dusnatého (NO) a reaktivních forem dusíku (RNS) v živých organismech a v zaměření na úlohu NO/RNS v rámci imunitního systému hmyzu;
- známé poznatky o funkcích NO u včely medonosné;
- charakteristiku imunitního systému včely medonosné;
- známé poznatky o antimikrobiálních peptidech (AMP) včely medonosné.

### **Praktická část**

- Stanovení hladin metabolitů NO u včel krmených modulátory hladin NO (L-arginin, L-NAME) po jejich imunizaci
  - spektrofotometrické stanovení obsahu S-nitrosothiolů (RSNO).
- Stanovení hladin vybraných AMP (abaecin, hymenoptaecin, defensin-1) u včel krmených modulátory hladin NO po jejich imunizaci
  - imunochemické stanovení hladin AMP metodou ELISA.



# 1 ÚVOD

Oxid dusnatý (NO) je důležitou signální molekulou v organismu obratlovců i bezobratlých. NO je malá molekula, která je schopná difundovat přes buněčné membrány, což se u živých organismů významně uplatňuje například v rámci procesů buněčné signalizace (Hughes, 2008). NO jakožto signální molekula se v živých organismech účastní fyziologických procesů, mezi které patří např. vazodilatace (Picón-Pagès et al., 2019) u obratlovců a regulace řady dějů v rámci nervové soustavy jak u obratlovců, tak u bezobratlých (Regehr et al., 2009, Mizunami & Matsumoto, 2017). NO se rovněž účastní signálních pochodů týkajících se řady imunitních drah vedoucích k indukci tvorby antimikrobiálních látek v reakci na přítomnost patogenního organismu nebo cizorodých částic u obratlovců i bezobratlých (Davies & Dow, 2009, Bogdan, 2015). NO v rámci imunitního systému také přímo interaguje s přítomným patogenním organismem. Tato interakce může vést k poškození biomolekul patogenního organismu (např. nukleových kyselin, enzymů, proteinů apod.), což má často pro patogenní organismus fatální dopad (Bogdan, 2015). Při vysokých koncentracích NO v organismu dochází k tvorbě jeho reaktivnějších forem (např. peroxydusitan  $\text{ONOO}^-$ ). NO a jeho reaktivní formy za těchto podmínek interagují s biomolekulami daného organismu (např. nukleových kyselin, proteinů), což vede k jejich poškození a narušení jejich fyziologické funkce (Wendehenne et al., 2001; Bottari, 2015).

NO je v organismu tvořen převážně z L-argininu (L-Arg) enzymovou aktivitou NOSynthasy (NOS). U savců se vyskytují 3 isofomy tohoto enzymu, a to konkrétně endoteliální NOS (eNOS), neuronální NOS (nNOS) a indukibilní NOS (iNOS). U včely medonosné se nachází pouze jedna isoforma NOS (Davies, 2000). NO může vznikat i redukcí dusitanů, a to buď enzymově prostřednictvím xantinoxidasy (XO; EC 1.17.3.2) (Zhang, 1998), nebo neenzymově disproportionací dusitanu v kyselém prostředí, případně redukčními reakcemi dusitanu v kyselém prostředí nebo za nedostatku kyslíku ve tkáních, tedy za hypoxických podmínek organismu (Bogdan, 2015). Dále NO vzniká z S-nitrosothiolů (RSNO), které jsou zásobními a transportními formami v organismu. Mezi nejvýznamnější zástupce RSNO se řadí S-nitrosoglutathion (GSNO) (Broniowska et al., 2013).

V humorální imunitě bezobratlých např. u blyškavky červivcové (*Spodoptera exigua*), bource morušového (*Bombyx mori*) (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018), bource dubového (*Antheraea pernyi*) (Liu et al., 2020), nebo octomilky obecné (*Drosophila*

*melanogaster*) NO indukuje v reakci na přítomnost patogenního organismu zvýšenou genovou expresi antimikrobiálních peptidů (AMP) (Davies & Dow, 2009). U včely medonosné (*Apis mellifera*) tato souvislost zatím nebyla zkoumána, nicméně se předpokládá, že i zde NO ovlivňuje produkci AMP obdobným způsobem jako u výše jmenovaných zástupců bezobratlých.

AMP u včely medonosné nejsou specifické pro dané patogeny, protože včela má pouze nespecifickou – vrozenou humorální imunitu. Produkce AMP u včely medonosné probíhá v tukovém tělese a v hemocytech. Mezi včelí AMP patří abaecin (Aba), defensiny (defensin-1 (Def-1) a defensin-2 (Def-2), hymenoptaecin (Hym) a apidaeciny, které plní funkci komplementu – svojí vazbou na povrchové struktury patogenních organismů způsobují perforaci buněčných membrán těchto patogenních organismů, což v konečném důsledku vede k usmrcení patogenů. AMP mohou také prostupovat lipidovou membránou patogenních organismů a interagovat s proteiny, DNA, RNA a buněčnými kompartmenty. Tuto schopnost mají apidaecin a Aba. Dále vazba AMP na povrchové struktury patogenního organismu slouží k označení patogenních organismů určených k destrukci (Daníhlík, 2011; Daníhlík et al., 2016).

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 NO a RNS v živých organismech

Oxid dusnatý (NO) je malá molekula obsahující nepárový elektron v protivazebném molekulovém orbitalu typu  $\pi$ . Tento nepárový elektron je delokalizovaný mezi atomem dusíku a kyslíku, což způsobuje jeho nižší reaktivitu v porovnání s jinými molekulami majícími radikálový charakter, pro který je charakteristická rychlá difuze z místa jeho vzniku. V živých organismech je klíčovou složkou mnoha fyziologických procesů. Může vystupovat jako signální i škodlivá molekula v závislosti na jeho koncentraci v organismu (Hughes, 2008).

Jedním z enzymů, který katalyzuje vznik NO u obratlovců a bezobratlých je NOSynthasa (NOS; EC 1.14.13.39). NO je v tomto případě tvořen z L-Arg. U bezobratlých se vyskytuje pouze jedna isoforma NOS, kdežto u obratlovců se vyskytuje více isoform NOS, konkrétně eNOS, nNOS a iNOS. NO produkovaný eNOS je zapojen do procesu vazodilatace. Produkce NO prostřednictvím nNOS zajišťuje intracelulární signalizaci v rámci nervové soustavy. Produkce NO katalyzovaná těmito dvěma isoformami NOS je regulována  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Naproti tomu tvorba NO prostřednictvím iNOS je na buněčných hladinách  $\text{Ca}^{2+}$  nezávislá a je indukována za stresových podmínek, např. v odpovědi na přítomnost patogenního organismu (Davies, 2000; Adams, 2015; Picón-Pagès, 2019). Mezi další enzymy, které se podílejí na tvorbě NO, patří např. xantinoxidasa (XO; EC 1.17.3.2), která katalyzuje redukci dusitanů v přítomnosti nikotinamidadeninukleotidu (NADH) v živých organismech (Zhang, 1998). NO může také vznikat z GSNO prostřednictvím Cu/Zn superoxiddismutasy (CuZnSOD; EC 1.15.1.1), glutathionperoxidasy (GPx, EC 1.11.1.9) a XO (Broniowska et al., 2013). NO může v organismu vznikat i neenzymovou cestou, a to například z dusitanu v kyselém prostředí (Bogdan, 2015), nebo působením ultrafialového záření, čímž dochází k homolytickému štěpení RSNO a vzniku NO (Kim et al., 2014).

Významný biologický účinek mají i RNS. Jedná se o vysoce reaktivní molekuly odvozené od dusíku, které obsahují nepárový elektron. Mezi nejvýznamnější RNS v živých organismech patří ( $\text{ONOO}^-$ ) a oxid dusičitý ( $\text{NO}_2$ ).  $\text{ONOO}^-$  vzniká reakcí oxidu dusnatého se superoxidovým anionradikálem ( $\text{O}_2^-$ ) (Adams, 2015). RNS hrají klíčovou roli v procesu nitrace a S-nitrosace proteinů, což je jeden z druhů posttranslační

modifikace proteinů vedoucích ke změně aktivity enzymů. RSNO vzniklé S-nitrosací jsou také zásobními a transportními formami NO (Wendehenne et al., 2001, Broniowska et al., 2013).

### **2.1.1 Funkce NO u člověka a savců**

NO může mít v rámci biologických procesů prospěšný či škodlivý účinek. Pozitivní účinek NO je obecně spojován s jeho nízkými hladinami v buňce a jeho účastí v řadě signálních drah. Naopak ke škodlivému účinku NO dochází při jeho vysokých hladinách a za tvorby jeho reaktivnějších forem jako je např. ONOO<sup>-</sup> (Regehr et al., 2009; Drechsel et al., 2012; Bahadır et al., 2014).

#### **2.1.1.1 Prospěšné účinky NO**

NO v těle obratlovců i bezobratlých plní hned několik důležitých funkcí. Obecně jsou to funkce signální za fyziologických podmínek nebo v rámci imunitního systému. Mezi fyziologické procesy, kterých se NO účastní jako signální molekula, patří u obratlovců např. signalizace v centrální a periferní nervové soustavě (Regehr et al., 2009), regulace krevního tlaku (Picón-Pagès et al., 2019), ovlivnění permeability cévního endotelu (Thibeault, 2010) a procesy spojené s dozráváním oocytů (Tiwari et al., 2017). V rámci imunitních procesů NO může přímo interagovat s biomolekulami patogenního organismu (Bogdan, 2015), nebo může vystupovat jako signální molekula v imunitních drahách (Yabuki et al., 2009, Ito et al., 2013, Bogdan, 2015).

NO je důležitým neurotransmiterem v rámci nervové soustavy obratlovců i bezobratlých. NO vyskytující se v mozku vzniká v neuronech, gliích a cévních buňkách. V mozku působí jako retrogradní neurotransmiter, je tedy tvořen postsynaptickým neuronem, odkud difunduje do presynaptického neuronu, kde interaguje s příslušnými receptory (Regehr et al., 2009).

Další významnou funkcí oxidu dusnatého u obratlovců je zprostředkování přenosu signálu vedoucímu k rozšíření cév v důsledku zvýšení tlaku krve. Produkce NO prostřednictvím eNOS v endoteliálních buňkách je indukována zvýšením hladiny Ca<sup>2+</sup> iontů uvnitř endoteliálních buněk (Picón-Pagès et al., 2019). Zvýšené hladiny NO v endotelu cév také vedou ke zvýšené permeabilitě cévního endotelu. Zvýšení permeability cévního endotelu je důležité v procesu angiogeneze (Thibeault, 2010).

V neposlední řadě je NO také významnou složkou imunitního systému obratlovců i bezobratlých. Produkce NO iNOS je indukována přítomností patogenního organismu. U obratlovců je NO tvořen makrofágy. Antimikrobiální účinky NO a RNS lze rozdělit na přímé a nepřímé. Přímé účinky NO a RNS jsou založeny na přímé reakci NO a RNS se strukturami patogenního organismu (s nukleovými kyselinami a složkami replikačního aparátu, s enzymy, nebo s molekulami odpovědnými za virulenci). Tyto reakce vedou k narušení funkce jmenovaných biomolekul, což následně vede u mnoha patogenních organismů k zastavení jejich množení, případně až k jejich usmrcení. Nepřímé účinky jsou naopak založeny na signalizaci NO v rámci drah patogenního organismu. Jedním z mechanismů nepřímého účinku je indukce apoptózy patogenní buňky vedoucí k limitaci růstu patogenního organismu (Bogdan, 2015). Indukce apoptózy pomocí NO zahrnuje aktivaci enzymů kaspas (EC 3.4.22), což jsou cysteinové proteasy, které jsou zapojeny do procesu apoptózy (Yabuki et al., 2009). Dalším nepřímým mechanismem účinku NO je S-guanylace cysteinových zbytků proteinů bakterií. Z NO se formují RNS, které vedou k nitraci druhého posla cyklického guanidinmonofosfátu (cGMP), což vede ke vzniku 8-nitro-cyklického adenosinmonofosfátu (8-nitro-cGMP). 8-nitro-cGMP zprostředkovává S-guanylace. S-guanylace následně vede k autofagii bakteriálních buněk (Ito et al, 2013).

Je důležité zmínit, že některé patogenní organismy si vytvořily různé mechanismy, které jim poskytují ochranu vůči působení NO. Mezi tyto mechanismy patří tvorba molekul bránících účinku NO. Řadí se sem např. produkce thiolů o nízké molekulové hmotnosti, které chrání proteiny bakteriální buňky před účinky NO jednak tím, že přímo reagují s NO, a jednak tím, že reagují s proteiny již modifikovanými nitrosací, což vede ke vzniku nemodifikovaného proteinu. Konkrétně mezi tyto thioly patří např. glutathion, (Fang, 2004). Dalšími mechanismy poskytujícími ochranu patogenních organismů vůči působení NO jsou produkce detoxifikačních enzymů (např. bakteriální NADPH-závislý peroxiredoxin (EC 1.11.1.26) a reakce vedoucí k inhibici iNOS pomocí efektorových proteinů mikroorganismů např. u bakterií *Mycobacterium tuberculosis* a *Salmonella enterica*. Poškozené buněčné části patogenních organismů mohou být opraveny pomocí mechanismů oprav (např. proteasomální degradace nitrosylovaných proteinů bakterií a biosyntéza nových bakteriálních proteinů, které nahradí degradované proteiny v buněčných komponentech bakterie) (Bogdan, 2015). Kromě antimikrobiální aktivity

má NO rovněž antivirální aktivitu. Drake a kolektiv ve své studii zjistili, že antivirální aktivita lidských a myších eosinofilů zahrnuje i produkci NO (Drake et al., 2016).

### **2.1.1.2 Škodlivé účinky NO**

Ke škodlivým účinkům NO v organismu dochází při jeho vysokých hladinách a za tvorby jeho reaktivnějších forem jako je např.  $\text{ONOO}^-$ . RNS vystupují jako silná nitrační nebo oxidační činidla. RNS jsou vysoce reaktivní, mohou reagovat s biomolekulami nacházejícími se v buňkách, kterými jsou nukleové kyseliny, proteiny, lipidy a s antioxidantními molekulami o nízké molekulové hmotnosti. Tyto interakce vedou k poškození a ztrátě biologické funkce zmíněných buněčných komponent (Porrini et al., 2020).

V nervové soustavě vede poškození biomolekul v důsledku zvýšené hladiny NO k apoptóze neuronů. Poškození neuronů zapříčiněné mimo jiné i NO se uvádí jako příčina mnoha neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba nebo roztroušená skleróza (Drechsel et al., 2012).

NO je také významný faktor ovlivňující vznik a průběh rakovinového bujení. Pokud organismus dlouhodobě čelí zvýšeným hladinám NO, např. v důsledku probíhajících imunitních reakcí, ať už jde o akutní či chronické onemocnění, může docházet k poškození DNA vznikajícími RNS a k propuknutí rakovinného bujení. DNA poškozují  $\text{N}_2\text{O}_3$  a  $\text{ONOO}^-$ .  $\text{N}_2\text{O}_3$  může způsobovat deaminaci nukleových bází guaninu, adeninu a cytosinu za vzniku xantinu, hypoxantinu a uracilu. Vzniklé produkty způsobují chyby při replikaci DNA, což vede ke vzniku mutací. Genotoxicita NO může mít vliv na vznik a rozvoj rakoviny.  $\text{ONOO}^-$  reaguje s guaninem za vzniku 8-oxoguaninu a 8-nitroguaninu. 8-nitroguanin jakožto vysoce nestabilní molekula může způsobovat narušení vláken DNA. 8-oxoguanin svou vysokou reaktivitou zapříčiňuje vznik dalších cytotoxických molekul majících oxidační účinky (Porrini et al., 2020). Nicméně NO může mít i protirakovinný účinek, a to díky jeho cytostatickému případně cytotoxickému účinku na rakovinné buňky (Korde Choudhari et al., 2013). Jeho cytostatický účinek spočívá v inhibici replikace DNA patogenního organismu (bakterií, hub, parazitů) pomocí inhibice enzymu ribonukleotidreduktasy (RNR; EC 1.17.4.1) (Lepoivre et al., 1992).

Bahadır a kolektiv ve své studii prokázali škodlivý vliv NO na srdeční tkáň po podání antibiotika Doxorubicinu patřícího do skupiny anthracyklinů. Toto antibiotikum zvyšuje

genovou expresi *iNOS*, což vede ke zvýšení hladiny NO v srdeční tkáni. Zvýšená hladina NO vede k tvorbě ONOO<sup>-</sup>, který způsobuje peroxidaci lipidů a následně k poškození buněk myokardu (Bahadır et al., 2014).

## 2.2 Funkce NO u bezobratlých

NO je významnou molekulou pro mnohé biologické pochody i u bezobratlých živočichů. Obdobně jako u obratlovců se NO účastní signalizace v rámci fyziologických procesů i v rámci imunitních odpovědí. NO se jako signální molekula u bezobratlých účastní např. regulace stahů hřbetní cévy (Silva et al., 2012; Ellison et al., 2015), signalizace v rámci nervové soustavy (Stern & Bicker, 2010), ovlivňuje cirkadiální chování (Kozlov et al., 2020) a ovlivňuje senzorické vnímání (Stern & Bicker, 2010). V rámci buněčné imunity je NO zapojen do procesu fagocytózy (Nazario-Toole & Wu, 2017; Hyršl, 2018), enkapsulace a nodulace (Dubovskiy et al., 2016). V rámci humorální imunity působí jako signální molekula, kdy se podílí na indukci genové exprese AMP (Foley & O'Farrell, 2003; Davies & Dow, 2009; Herrera-Ortiz et al., 2011; Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018; Liu et al., 2020), a jako cytotoxická molekula pro patogeny (Porrini et al., 2020; Nazario-Toole & Wu, 2017).

### 2.2.1 Obecné funkce NO

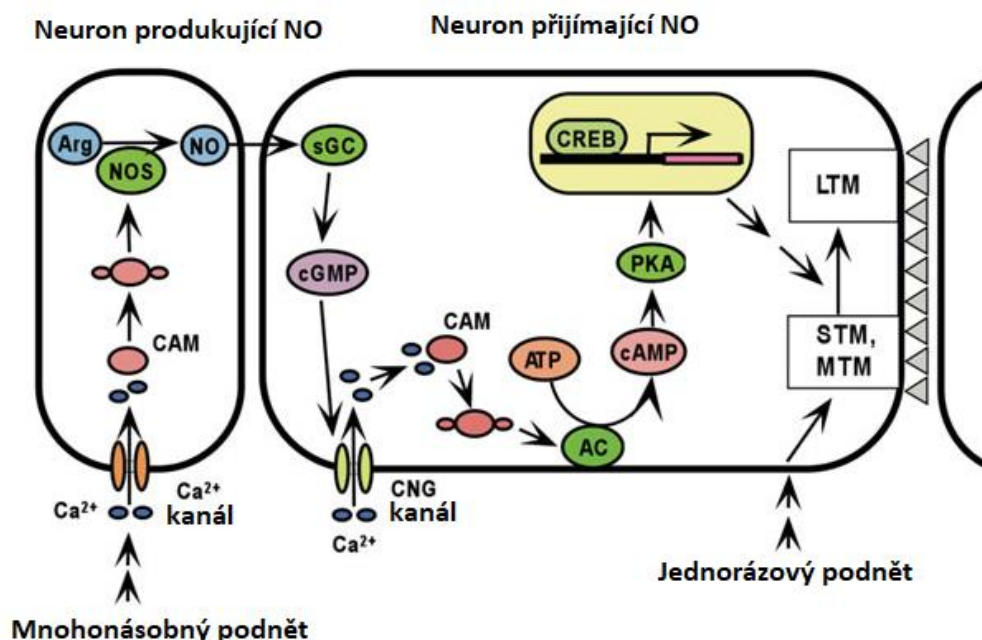
U bezobratlých hladina NO ovlivňuje stahy hřbetní cévy cGMP-závislým mechanismem. Vliv NO na frekvenci stahu hřbetní cévy byl prokázán např. u pakobylky rohaté (*Buculum extradentatum*), u sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*) (Silva et al., 2012) a u komára *Anopheles gambiae* (Ellison et al., 2015).

V nervové soustavě bezobratlých NO vystupuje jako signální molekula, obdobně jako u obratlovců. Produkce NO prostřednictvím NOS v nervové soustavě hmyzu je stimulována přítokem Ca<sup>2+</sup> iontů dovnitř donorové buňky, což vede k formaci komplexu Ca<sup>2+</sup> iontů s kalmodulinem (CaM), který svojí vazbou na NOS indukuje produkci NO. NO z donorové buňky difunduje přes cytoplasmatickou membránu dovnitř akceptorové buňky, kde aktivuje enzym solubilní guanylátcyklasu (sGC; EC 4.6.1.2), která se skládá ze dvou podjednotek a hemové skupiny, na kterou se NO kovalentně váže. Aktivovaná sGC katalyzuje vznik cGMP z guanosintrifosfátu (GTP). Vzniklé molekuly cGMP následně zprostředkovávají otevírání iontových kanálů, proteinkinasy G (PKG; EC 2.7.11.16) a cGMP závislých fosfodiesteras a ovlivňují další signální dráhy spojené s cGMP (Bicker, 2001; Mizunami et al. 2015; Wright, 2019). U larev sarančete

stěhovavého NO v nervové soustavě reguluje cGMP závislým mechanismem růst výběžků periferních neuritů, migraci embryonálních neuronů během utváření enterálního nervového systému, rozvoj motorových neuronů v nervové soustavě během utváření synapsí a růst axonů v místě poškození neuronů (Stern & Bicker, 2010).

Signalizace NO je u hmyzu rovněž spojena s tvorbou dlouhodobé paměti (LTM). Zapojení NO do procesu tvorby LTM se u různých druhů hmyzu může lišit. NO je např. zapojen do procesu LTM u cvrčka dvouskvrnného (*Gryllus bimaculatus*) a včely medonosné (Mizunami et al., 2015; Mizunami & Matsumoto, 2017). Naopak u octomilky obecné NO do tohoto procesu podle známých poznatků zapojen není (Davis, 2011). V procesu tvorby LTM u cvrčka dvouskvrnného (*G. bimaculatus*) NO/cGMP signální dráha předchází signalizaci cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP) zprostředkávající proteosyntézu proteinů nezbytných pro LTM (Matsumoto et al., 2009, Mizunami et al., 2015; Mizunami & Matsumoto, 2017). Zvýšená hladina cGMP v neuronu vede k otevření nukleotidy řízeného kanálu pro přenos  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (CNG). To způsobí přítok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů dovnitř neuronu. Zvýšená hladina  $\text{Ca}^{2+}$  iontů vede k formaci komplexu  $\text{Ca}^{2+}$  s kalmodulinem CaM. CaM aktivuje adenylátcyklasu (AC; EC4.6. 1.1), která katalyzuje přeměnu ATP na cAMP, který aktivuje cAMP-proteinkinasu A (PKA; EC 2.7.11.11). PKA následně aktivuje transkripční faktor citlivý na cAMP (CREB) (Mizunami & Matsumoto, 2017). Aktivace CREB vede ke spuštění proteosyntézy proteinů potřebných pro dlouhodobé propojení neuronů, což je nezbytný proces při tvorbě LTM (Matsumoto et al., 2009). Celý proces je uveden na schématu na Obr. 1 (Mizunami & Matsumoto, 2017).





Obr. 1 Signalizace vedoucí k tvorbě LTM v nervové soustavě cvrčka dvouskvrnného (*G. bimaculatus*). Jednorázový podnět vede pouze k tvorbě STM a MTM, kdežto mnohonásobný podnět zprostředkovává tvorbu LTM. Signální kaskáda vedoucí k tvorbě LTM je spuštěna přítokem Ca<sup>2+</sup> iontů dovnitř neuronu produkujícího NO, čímž se spustí NO/cGMP signální dráha vedoucí k tvorbě cGMP v neuronu přijímajícím NO. Zvýšené hladiny cGMP uvnitř neuronu vedou k otevření CNG kanálu, skrze který přitékají Ca<sup>2+</sup> ionty dovnitř neuronu. To vede k formaci CaM, který aktivuje AC katalyzující přeměnu ATP na cAMP. Vzniklé cAMP aktivuje PKA, která aktivuje CREB transkripční faktor. To spustí transkripci genu příslušného proteinu a jeho následnou proteosyntézu, což je nezbytný proces při tvorbě LTM (Převzato a upraveno podle Mizunami & Matsumoto, 2017).

Tato signální kaskáda je u cvrčka (*G. bimaculatus*) stejná pro tvorbu LTM jak v rámci čichové paměti, tak v rámci zrakové paměti (Matsumoto et al., 2013). Nervová soustava řídí i cirkadiální chování, na které má hladina NO rovněž vliv, což bylo demonstrováno např. ve studii s octomilkou obecnou (Kozlov et al., 2020).

NO také hraje významnou roli v senzoričtém vnímání hmyzu, a to jak ve vnímání mechanických, čichových, tak i chuťových podnětů (Kurylas et al., 2005). Například u sarančete pustinného (*Schistocerca gregaria*) NO zprostředkovává vnímání mechanických podnětů v neuropilech (Davies, 2000), což potvrzuje i studie Kurylase a kolektivu, kde byla v neuropilech *S. gregaria* prokázána zvýšená genová exprese NOS. NO ovlivňuje i vnímání chutí. NO působí jako signální molekula v hrudních gangliích, kde se chuťové vjemy zpracovávají. Vliv NO na vnímání chuťových podnětů bylo prokázáno např. u sarančete, cvrčka a švába (Kurylas et al., 2005). Modulace čichového vnímání pomocí NO bylo pozorováno např. u motýla *Manduca sexta* (Wilson et al.,

2007), u krev sajícího hmyzu *Rhodnius prolixus* (Sfara *et al.*, 2011) a octomilky obecné (Faghihi *et al.*, 2017). NO je produkován v anténním laloku *M. sexta* v odezvě na čichový podnět. Čichový podnět vyvolá aktivaci NOS pomocí neuromodulátorů, jako je například serotonin, které spouští přítok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů z presynaptického neuronu do synaptické štěrbině, což vede ke zvýšené produkci NO. NO v procesu vnímání čichového podnětu ovlivňuje vodivost membrán neuronů (Wilson *et al.*, 2007).

NO se u hmyzu rovněž podílí na imunitní odpovědi. Jedná se o důležitou signální molekulu imunitních drah hmyzu, která je v odpovědi na přítomnost patogenního organismu, nebo cizorodé částice, u bezobratlých živočichů tvořena v hemocytech (Foley & O'Farrell, 2003). NO je u bezobratlých zapojen jak do buněčné imunity, tak do humorální imunity (Liu *et al.*, 2020; Dubovskiy *et al.*, 2016; Hyršl, 2018; Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018).

V rámci buněčné imunity je NO zapojen do procesu fagocytózy (Nazario-Toole & Wu, 2017; Hyršl, 2018), enkapsulace a nodulace (Dubovskiy *et al.*, 2016). Během procesu fagocytózy je NO tvořen fagocyty, což jsou imunitní buňky pohlcující patogeny a cizorodé částice (Hyršl, 2018). NO je během tohoto procesu tvořen na cytosolové straně fagocytu, odkud proniká dovnitř fagocytu, kde dochází k formaci RNS při interakci NO s reaktivními formami kyslíku (ROS) (Nazario-Toole & Wu, 2017). NO a vzniklé RNS v tomto případě přímo reagují s biomolekulami patogenu, což vede k poškození patogenního organismu, nebo až k jeho usmrcení (Nazario-Toole & Wu, 2017; Porrini *et al.*, 2020). Nodulace a enkapsulace jsou procesy, které zahrnují agregaci cirkulujících hemocytů kolem cizorodých částic a produkci antimikrobiálních látek (cytotoxického pigmentu melaninu během procesu melanizace a NO) těmito hemocyty. Nodulace se uplatňuje u patogenů menších rozměrů, enkapsulace se uplatňuje u patogenů větších rozměrů. Agregace hemocytů kolem cizorodých částic zajišťuje izolaci patogena od vnitřního prostředí hostitele a produkce antimikrobiálních látek zajišťuje destrukci biomolekul patogena, což vede k jeho usmrcení (Hyršl, 2018). Během procesu nodulace a enkapsulace má NO dvojí roli. Jednak působí jako cytotoxická molekula spolu s RNS obdobně jako je tomu u fagocytózy (Dubovskiy *et al.*, 2016) a jednak působí jako signální molekula (Sanzhaeva *et al.*, 2016; Dubovskiy *et al.*, 2016; Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). Signalizace NO vede k zesílení melanizace, avšak při vyšších lokálních koncentracích NO naopak melanizaci inhibuje (Sanzhaeva *et al.*, 2016; Dubovskiy *et al.*, 2016), což bylo prokázáno ve studii se zavíječem voskovým (*Galleria mellonella*)

(Sanzhaeva et al., 2016). U blyškavky červivcové bylo zjištěno, že NO aktivuje fosfolipasu A2 (PLA 2; EC 3.1.1.4), což vede k indukci eikosanoidové signalizace spouštějící nodulaci (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018).

V rámci humorální složky imunity hmyzu NO působí jako signální molekula, která zprostředkovává indukci tvorby antimikrobiálních látek např. AMP. Indukce genové exprese AMP prostřednictvím NO signalizace byla prokázána například u motýla *Manduca sexta*, bource morušového, blyškavky červivcové (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018), bource dubového (Liu et al., 2020), komára *Anopheles albimanus* (Herrera-Ortiz et al., 2011) a octomilky obecné (Foley & O'Farrell, 2003; Davies & Dow, 2009). Zapojení NO do humorální imunity hmyzu se může mezi jednotlivými druhy hmyzu lišit. U blyškavky červivcové je produkce NO prostřednictvím NOS aktivována Toll a IMD drahami. NO zde aktivuje PLA 2, která produkuje kyselinu arachidonovou. Z kyseliny arachidonové jsou následně pomocí enzymů cyklooxygenasy (COX; EC 1.14.99.1), lipoxygenasy (LOX; EC 1.13.11.12) a epoxygenasy (EC 1.14.14.1) tvořeny eikosanoidy (prostaglandin, leukotrien, epoxyeikosatrienová kyselina), které indukují genovou expresi AMP (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). U octomilky obecné Toll a IMD dráha indukují produkci NO pomocí NOS, což vede k produkci AMP (Foley & O'Farrell, 2003). U octomilky obecné je produkce NO prostřednictvím NOS indukována rovněž Toll a IMD drahami. NO následně indukuje tvorbu AMP v Malpighiho trubicích pomocí aktivace sGC, která formuje cGMP (Davies & Dow, 2009). Produkce NO prostřednictvím NOS je u komára *A. gambiae* aktivována pomocí STAT dráhy (Gupta et al., 2009).

Jak již bylo zmíněno, NO působí i jako neurotransmitter v nervové soustavě. Bergman a kolektiv (2021) studovali u embryí sarančete stěhovavého souvislost produkce NO hemocyty během imunitní reakce se signalizací NO v rámci nervové soustavy. Ve studii bylo prokázáno zvýšení hladin cGMP v neuritech po jejich kontaktu s hemocyty produkujícími NO. V souvislosti s tímto zjištěním autoři předpokládají, že NO/cGMP signální drahou mohou hemocyty zprostředkovávat imunitní reakci v nervové soustavě (Bergmann et al, 2021).

## **2.3 Funkce NO u včely medonosné**

Stejně jako u mnoha jiných druhů hmyzu je NO u včely medonosné zapojen do řady biologických procesů zahrnujících fyziologické procesy a procesy spojené s imunitní odpovědí. Mezi fyziologické procesy, v nichž NO u včely medonosné vystupuje, patří signalizace v rámci tvorby LTM a sensorického vnímání v nervové soustavě (Watanabe et al., 2007) a regulace stahů hřbetní cévy (Aluko et al., 2014). V rámci imunitních reakcí NO interaguje s biomolekulami patogenních organismů, což v konečném důsledku může vést až k jejich usmrcení (Negri et al., 2014; Porrini et al., 2020), dále ovlivňuje procesy enkapsulace a nodulace (Negri et al., 2013; Negri et al., 2014) a pravděpodobně indukuje genovou expresi AMP podobným obdobně jako u jiných druhů hmyzu (Foley & O'Farrell, 2003; Evans et al., 2006; Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018).

### **2.3.1 Obecné funkce**

Podobně jako u jiných druhů hmyzu je i u včely medonosné NO významnou signální molekulou v nervové soustavě, kde je zapojen do procesu tvorby LTM a sensorického vnímání. V obou zmíněných procesech NO aktivuje sGC, která produkuje cGMP. V procesu vnímání čichových podnětů vede NO/cGMP signalizace k aktivaci PKA (Watanabe et al., 2007). NO u včely medonosné pravděpodobně také ovlivňuje stahy hřbetní cévy, nicméně mechanismus není ještě zcela objasněný (Aluko et al., 2014).

### **2.3.2 Funkce NO v imunitě včely medonosné**

NO má v rámci imunity včely medonosné svoji důležitou úlohu. NO je i u včely medonosné zapojen do buněčné a humorální složky imunity. V rámci buněčné imunity NO je zapojen do procesů nodulace a enkapsulace, během kterých ovlivňuje agregaci hemocytů kolem cizorodých částic a patogenů (Negri et al., 2013; Negri et al., 2014). V rámci humorální složky imunity je NO efektorovou i signální molekulou. Jako efektorová molekula NO interaguje s biomolekulami patogenního organismu, což vede k poškození těchto biomolekul, které může vést k usmrcení patogenního organismu. Vysoké koncentrace NO v organismu jsou však toxické i pro hostitelský organismus (Negri et al., 2014; Porrini et al., 2020). Jako signální molekula se NO pravděpodobně účastní imunitních drah vedoucích k produkci AMP obdobně, jako je tomu u jiných druhů hmyzu (Negri et al., 2014). Dá se předpokládat, že produkce NO prostřednictvím NOS je u včely medonosné v rámci imunitní odpovědi regulována Toll a IMD drahami, stejně, jako je tomu u blyškavky červivcové (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018) nebo

u octomilky obecné (Foley & O'Farrell, 2003), protože Toll i IMD dráha patří do imunitních drah nacházejících se u včely medonosné (Evans et al., 2006).

## 2.4 Metabolismus NO

Molekula NO v organismu může vznikat enzymovou nebo neenzymovou cestou. Enzymově může vznikat z L-Arg prostřednictvím NOS. Neenzymově NO vzniká v živých organismech za nedostatku kyslíku (hypoxické podmínky) v organismu, nebo z dusitanu v kyselém prostředí (Bogdan, 2015).

Molekula NO se nemůže v organismu dlouhodobě vyskytovat vzhledem ke své vysoké reaktivitě. NO může být v organismu oxidován na dusitany a dusičnany (Lundberg & Weitzberg, 2010), při jeho vysokých koncentracích dochází k tvorbě RNS (Porrini et al., 2020). NO a od něj odvozené RNS mohou také modifikovat proteiny v procesu S-nitrosace proteinů (Jahnová et al., 2013; Bottari, 2015), nebo nitrace proteinů. Jak S-nitrosace, tak nitrace proteinů v živých organismech nejčastěji probíhají bez enzymové katalýzy (Bottari, 2015). Metabolity NO mohou v organismu sloužit jako zásobní a transportní formy NO (Zhang, 1998; Lundberg & Weitzberg, 2010; Kim et al., 2014; Bogdan, 2015).

### 2.4.1 S-nitrosothioly

RSNO vznikají v procesu S-nitrosace proteinů. Během S-nitrosace proteinů dochází k vazbě nitrosoniového kationtu ( $\text{NO}^+$ ) na thiolovou skupinou ( $-\text{SH}$ ) vyskytující se v postranním řetězci některých aminokyselin (např. v cysteinu). Nejčastěji probíhá S-nitrosace přes tvorbu reaktivních oxidů dusíku, kterými jsou např. oxid dusitý ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) a dimerní oxid dusičitý ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ). Ke vzniku RSNO dochází také během přímé reakce  $\text{NO}^+$  s  $-\text{SH}$  a při reakci  $\text{ONOO}^-$  s  $-\text{SH}$  skupinou. Přímá reakce NO s  $-\text{SH}$  skupinou proteinů není v živých organismech příliš obvyklá. Rovněž může docházet k tzv. transnitrosační reakci, během které dochází k přenosu nitrososkupiny z molekuly RSNO na molekulu jiného thiolu. V rámci této reakce thiolátový aniont ( $\text{RS}^-$ ) nukleofilně atakuje atom dusíku v molekule RSNO (Jahnová et al., 2013). Ze studie Broniowské a kolektivu (2012) vyplývá, že formace RSNO může být zprostředkována i cytochromem c oxidasou. Nejprve se na cytochrom c oxidasu s  $\text{Fe}^{3+}$  slabě váže glutathion. Následuje reakce s NO, která vede k redukci  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$  a ke vzniku GSNO. Cytochrom c oxidasa zde funguje jako jednoelektronový akceptor. Popsaná reakce probíhá za aerobních i anaerobních podmínek (Broniowska et al., 2012).

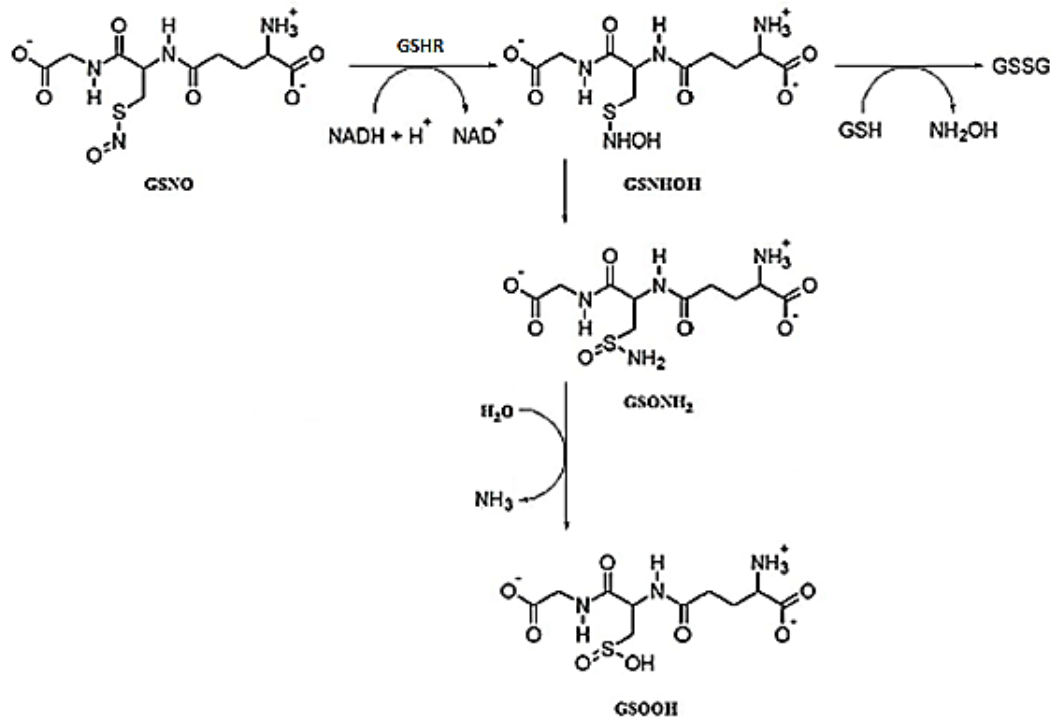
RSNO mají v organismech velký význam. Díky jejich vyšší stabilitě a nižší schopnosti pronikat přes cytoplasmatické membrány buněk v porovnání se samotnou molekulou NO se RSNO dostanou do vzdálenějších míst v organismu snáze než NO. Proto RSNO slouží jako donory NO, který je potřebný v signálních drahách (Jahnová et al., 2013).

Modifikace proteinů S-nitrosací hraje klíčovou roli v regulaci signálních drah, protože vzniklé RSNO mají odlišnou biologickou aktivitu než proteiny, od nichž jsou odvozené. Této modifikaci podléhají proteiny enzymů, transkripčních faktorů, receptorů či iontových kanálů. Skupiny –SH, na kterých S-nitrosace probíhá, jsou lokalizované v aktivních místech enzymů. S-nitrosace proteinů je reversibilní proces, díky čemuž může organismus regulovat funkci daných enzymů v závislosti na vnitřních a vnějších podmínkách v organismu. S-nitrosace může vést ke zvýšení, nebo snížení aktivity daných enzymů (Wendehenne et al., 2001). RSNO v organismu vystupují rovněž jako donory NO (Jahnová et al., 2013). Mezi významné zástupce RSNO patří GSNO odvozený od glutathionu (GSH). GSNO plní v organismu dvě funkce, je donorem NO a také zprostředkovává signalizaci NO (Broniowska et al., 2013).

Jak již bylo výše uvedeno, GSNO je v organismu donorem NO. NO může být z GSNO uvolněn např. prostřednictvím enzymů CuZnSOD, GPx a XO (Broniowska et al., 2013). GSNO se v živých organismech také účastní procesu transnitrosace, kdy dochází k přenosu nitrososkupiny z GSNO na jinou molekulu obsahující –SH skupinu. Tento proces je využit k transportu GSNO z extracelulárního prostředí dovnitř buňky, protože samotný GSNO nemá schopnost pronikat do buněk. Nejčastěji dochází k přenosu nitrososkupiny z GSNO na L-cystein, za vzniku S-nitroso-L-cysteinu, který následně vstupuje do buňky pomocí aminokyselinového transportního L systému (L-AT). Uvnitř buňky může dojít k transaminaci, kdy je nitrososkupina přenesena z S-nitroso-L-cysteinu na GSH, nebo dochází k přímé S-nitrosaci proteinů zprostředkovávajících buněčnou odpověď (Broniowska et al., 2013).

Účinky GSNO jsou ovlivněny enzymy, které ho rozkládají. Především se jedná o enzym GSHreduktasu (GSHR, EC 1.8.1.7). Během rozkladu GSNO prostřednictvím GSHR vzniká S-hydroxylaminoglutathion. S-hydroxylaminoglutathion (GSNHOH) dále reaguje s GSH a dochází ke vzniku disulfidu glutathionu (GSSG) a hydroxylaminu (NH<sub>2</sub>OH). Při nízkých koncentracích GSH se S-hydroxylaminoglutathion rozkládá

za vzniku amoniaku ( $\text{NH}_3$ ) a sulfinové kyseliny odvozené od glutathionu (Obr. 2). GSHR je důležitým enzymem regulujícím hladiny GSNO v organismu (Broniowska et al., 2013, Jahnová et al., 2019).



Obr. 2 Rozklad S-nitrosogluthionu (GSNO) prostřednictvím GSHreduktasy (GSHR). GSNO je prostřednictvím reduktasové aktivity GSHR převeden na S-hydroxylaminogluthion (GSNHOH). GSNHOH dále reaguje s glutathionem (GSH) za vzniku disulfidu glutathionu (GSSG) a hydroxylaminu ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ). Při nízkých buněčných hladinách GSH dochází k samovolnému rozkladu GSNHOH na glutathionsulfenamid ( $\text{GSONH}_2$ ) a následné hydrolyze na sulfinovou kyselinu odvozenou od glutathionu ( $\text{GSSOH}$ ) a amoniak ( $\text{NH}_3$ ) (převzato a upraveno podle Jahnová et al., 2019).

## 2.4.2 Nitrované proteiny

Nitrace proteinů je zprostředkována  $\text{ONOO}^-$ , ale může zahrnovat i jiné RNS (Bottari, 2015). K nitraci dochází na postranních řetězcích proteinů, konkrétně na tyrosinových residuích za vzniku 3-nitro-tyrosinu. Reakce probíhá radikálovým mechanismem (Radi, 2013). Za fyziologických podmínek je nitrace proteinů redoxní signální drahou. Vysoké koncentrace  $\text{ONOO}^-$  v organismu během imunitní odpovědi mohou vést ke zvýšené nitraci proteinů, která vedle peroxidace lipidů a poškození DNA vede k poškození buněk (Bottari, 2015).

## 2.4.3 Dusitany a dusičnany

Dusičnany i dusitany mohou být tvořeny v živých organismech z NO. Dusičnany se do organismu také mohou dostat v přijímané potravě. Za aerobních podmínek NO v živých organismech podléhá oxidaci na dusitany. Další oxidací vzniklých dusitanů vznikají dusičnany (Lundberg & Weitzberg, 2010). U obratlovců NO reaguje s oxyhemoglobinem nebo oxymyoglobinem za vzniku dusičnanu (Gladwin et al, 2005).

Za hypoxických a ischemických podmínek jsou dusičnany a dusitany redukovány zpět na NO. U obratlovců jsou dusitany převedeny na NO prostřednictvím reakce s hemoglobinem, myoglobinem, XO, enzymů obsahujících hemovou a thiolovou skupinu, případně neenzymovou redukcí v kyselém prostředí (Gladwin et al, 2005; Bryan, 2006). Přeměna dusitanu na NO prostřednictvím XO probíhá za hypoxických podmínek a při nízkých hodnotách pH. Za aerobních podmínek tato reakce neprobíhá, poněvadž kyslík je kompetitivním inhibítozem XO. Redukce dusitanu v mitochondrii probíhá za účasti ubiquinolu a cytochrom c oxidasy. Kyselá redukce dusitanů probíhá pouze v prostředí s nízkou hodnotou pH. V organismu obratlovců dochází ke kyselé redukci dusitanů v kyselém prostředí žaludku nebo při hypoxických podmínkách, kdy dochází k poklesu pH v příslušných tkáních (Bryan, 2006).

## 2.5 Imunitní systém včely medonosné

Imunitní systém včely medonosné je složen z několika složek, kterými jsou sociální imunita, fyzikální bariéry (Daníhlík, 2011), buněčná imunita (Negri et al., 2016), humorální imunita (Daníhlík, 2011) a epitheliální imunita (Jefferson et al., 2013).

Sociální imunita včely medonosné je založena na chování jedinců ve společenstvu, které vede ke snížení rizika nákazy celého společenstva. Do sociální imunity se řadí párová imunita (např. grooming, kdy se jedinci vzájemně čistí), čistící pud, používání



antimikrobiálních látek ke stavbě úlu a k desinfekci úlu (např. propolisu), zvýšení teploty v úlu a ochrana před vniknutím patogena do úlu (Daníhlík, 2011; Conte et al., 2011; Negri et al., 2016). Conte a kolektiv ve své studii prokázali, že sociální imunita včely medonosné je geneticky kódovaná (Conte et al., 2011).

Nedílnou součástí imunity včely medonosné jsou fyzikální bariéry (zejména kutikula a stěna střeva), které brání vstupu patogenních organismů a cizorodých částic do organismu (Daníhlík, 2011).

Buněčná imunita včely medonosné stejně jako u jiných druhů hmyzu zahrnuje procesy fagocytózy, nodulace, enkapsulace. Tyto procesy jsou zprostředkovány imunitními buňkami – hemocyty. Hemocyty jsou zodpovědné za rozpoznávání cizorodých částic od tělních buněk hostitele. Po rozpoznání cizorodé částice se neaktivované adherentní hemocyty přemění na aktivované adherentní hemocyty, které se začnou shlukovat kolem cizorodé částice. Malé cizorodé částice a patogenní organismy jsou pohlceny hemocyty během procesu fagocytózy, u větších cizorodých částic dochází k izolaci cizorodých částic nebo patogenních organismů od vnitřního prostředí hostitele v rámci procesů nodulace a enkapsulace. Popsané procesy buněčné imunity se vyskytují ve všech vývojových stádiích včely medonosné a jejich průběh se v závislosti na vývojovém stádiu včely medonosné nemění. Jednotlivá vývojová stádia včely medonosné se pouze liší v počtu hemocytů. Nejvíce hemocytů se vyskytuje u larev a kukel, méně ve vajíčkách a nejméně u dospělých včel. Stáří včel ovlivňuje i schopnost nodulace. U starších včel je schopnost vytvářet noduly snižena, či úplně chybí (Negri et al., 2016).

Humorální imunita včely medonosné je založena na tvorbě antimikrobiálních molekul a molekul účastnících se signalizace v rámci imunitních signálních drah. Do humorální imunity včely medonosné se řadí produkce AMP, dále pak signalizace v enzymových kaskádách regulujících proces srážení hemolymfy při poškození epitelu, fenoloxidasová kaskáda vedoucí k tvorbě melaninu v rámci procesu melanizace (Daníhlík, 2011; Negri et al., 2016). U včely medonosné byly popsány imunitní dráhy Toll, IMD, JAK/STAT a JNK. Toll a IMD dráha vedou k indukci exprese AMP a lysozymů a aktivují fenoloxidasovou kaskádu. Toll signální dráha je zapojena kromě imunitní odpovědi i do fyziologických procesů spojených s vývojem organismu, zatímco IMD dráha je zapojena pouze do imunitní odezvy. IMD dráha je spojována se signalizací v rámci imunitní reakce proti gramnegativním ( $G^-$ ) bakteriím, avšak i některé grampozitivní ( $G^+$ )

bakterie obsahující kyselinu diaminopimelovou ve své buněčné stěně spouštějí tuto dráhu. JAK/STAT dráha vede k indukci exprese AMP, urychluje proliferaci (množení) hemocytů, podporuje proces fagocytózy a podílí se na imunitní odpovědi v průběhu virové infekce. JAK/STAT dráhu aktivují virové infekce (Evans et al., 2006; Danihlík, 2011). JNK dráha je aktivována IMD dráhou, která je aktivována  $G^-$  bakteriemi a některými  $G^+$  bakteriemi. JNK dráha vede k apoptóze bakterií, indukci procesu melanizace a indukci genové exprese AMP (Danihlík, 2011).

Epitheliální imunita trávicího traktu včely medonosné se skládá jednak fyzikální bariéry, kterou tvoří endotelové buňky trávicího traktu, bránící průniku patogenů a cizorodých částic do organismu (Danihlík, 2011) a jednak zahrnuje složku humorální imunity, která spočívá ve spuštění signalizace v rámci imunitních drah a produkci AMP epitheliálními buňkami (Jefferson et al., 2013).

## **2.6 Antimikrobiální peptidy včely medonosné**

AMP jsou malé molekuly peptidové povahy obsahující vysoké množství cysteinových residuí. AMP mají významnou roli v rámci humorální imunity. Včelí AMP vykazují účinek pouze proti prokaryotním patogenům. Obecně účinek AMP spočívá ve vazbě na povrchové struktury patogenních organismů, což způsobí změnu membránového potenciálu buněčných membrán patogenů. V důsledku této změny dojde k vytvoření porů v buněčných membránách patogenů. Zvýšená propustnost membrán patogenních organismů i pro látky, které by za běžných podmínek neměly procházet, vede v konečném důsledku k usmrcení patogenního organismu. (Danihlík, 2011).

AMP u včely medonosné jsou produkovány hemocyty nebo tukovým tělesem (Danihlík, 2011), ale také epitheliálními buňkami trávicího traktu (Jefferson et al., 2013) v rámci imunitní odpovědi na přítomnost cizorodé částice nebo patogenního organismu. AMP včely medonosné se dělí podle své struktury na cyklické a lineární. Mezi cyklické AMP se řadí defensiny obsahující velké množství cysteinu (Cys) ve své struktuře. Mezi lineární AMP obsahující velké množství prolinu (Pro) patří Aba a apidaeciny. Mezi lineární AMP patří rovněž Hym obsahující velké množství glycinu (Gly). Včelí AMP jsou účinné proti bakteriím, houbám i virům. Jednotlivé AMP mohou být účinnější pro určitý druh patogenního organismu. Apidaecin a Hym je neúčinnější proti  $G^-$  bakteriím, zatímco Aba je účinnější proti  $G^+$  bakteriím. Aba a Hym jsou pravděpodobně produkovány i v rámci odezvy na virovou infekci. Defensiny (Def-1, Def-2) vyskytující

se v hemolymfě jsou účinné jak proti  $G^+$  a  $G^-$  bakteriím, tak i proti houbám, zatímco defensiny vyskytující se v mateří kašičce spolu s royalisinem je nejvíce účinný hlavně proti  $G^+$  bakteriím (Daníhlík, 2011; Jefferson et al., 2013, Daníhlík et al., 2016).

Včelí AMP plní funkci komplementu, tzn. že jejich působením na buněčné stěny bakterií dochází ke vzniku pórů v buněčných stěnách, což v konečném důsledku vede k usmrcení patogenního organismu (Daníhlík 2011). AMP mohou také prostupovat lipidovou membránu a uvnitř buňky patogenního organismu interagovat s proteiny, DNA, RNA nebo buněčnými kompartmenty. Schopnost volně prostupovat přes lipidovou membránu mají AMP bohaté na prolin (apidaecin, Aba). Jejich průchod přes lipidovou membránu nevede k lýzi buněk patogena. AMP svojí vazbou také označují patogenní organismy určené k destrukci (Daníhlík, 2011; Daníhlík et al., 2016).

Produkce AMP u včely medonosné je indukována prostřednictvím imunitních drah, a to Toll, IMD-JNK a JAK/STAT dráhy. Regulace produkce AMP zmíněnými drahami se u jednotlivých AMP liší. Biosyntéza Aba a Hym je regulována IMD drahou, biosyntéza defensinů je regulována Toll drahou (Daníhlík 2011; Daníhlík et al., 2016).

Na produkci AMP u včely medonosné má pravděpodobně vliv i hladina NO podobně, jako je tomu u jiných druhů hmyzu, např. u blyškavky červivcovité (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018), bource dubového (Liu et al., 2020) komára *Anopheles albimanus* (Herrera-Ortiz et al., 2011) či octomilky obecné (Foley & O'Farrell, 2003; Davies & Dow, 2009) u kterých bylo prokázáno, že zvýšené hladiny NO vedou ke zvýšené produkci AMP. Zatím nejsou známy žádné poznatky o souvislosti hladiny NO s produkcí AMP u včely medonosné.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál a přístroje

#### 3.1.1 Chemikálie

3, 3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) (Sigma-Aldrich, Německo)

36% kyselina chlorovodíková (HCl) (11,6 M) (Penta, Česká republika)

Aceton (Roth, USA)

AEBSF-HCl (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

Diethylether (Lachner, Česká republika)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lachner, Česká republika)

DL-Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Německo)

Dusitan sodný (NaNO<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich, Německo)

Glutathion (GSH) (Roth, USA)

Hydrogenuhlčitan sodný (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Lachner, Česká republika)

Hydrogenuhlčitan sodný (NaHCO<sub>3</sub>) (Lachner, Česká republika)

Hydroxid sodný (NaOH) (Lachner, Česká republika)

Chlorid rtuťnatý (HgCl<sub>2</sub>) (Lachema, Česká republika)

Chlorid sodný (NaCl) (Lachner, Česká republika)

Kyselina sírová 96% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina trifluoroctová 99% (Sigma-Aldrich, Německo)

Monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Česká republika)

Monohydrát kyseliny citronové (Lachner, Česká republika)

N-(1-naftylethylen)diamin (Sigma-Aldrich, Německo)

Perborát sodný tetrahydrát (Merck, USA)

primární králičí polyklonální protilátka proti Aba, Def-1 a Hym (Clonestar, USA)

Sekundární kozí anti-králičí Ab značené křenovou peroxidasou (Sigma-Aldrich, Německo)

Sulfanilamid (Sigma-Aldrich, Německo)

Sušené mléko (Roth, USA)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Thermo Fisher Scientific, Belgie)

Triton® x-100 (Thermo Fisher Scientific, Belgie)

Tween 20 (Roth, USA)

Uhličitan sodný (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Lachner, Česká republika)

### **3.1.2 Přístroje a vybavení**

Analytické váhy Denver Summit (Denver Instruments, USA)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Digitální pH metr (XS Instruments, Itálie)

ELISA destičky – Corning® 96 Well EIA/RIA Assay Microplate (CLS9018) (Sigma-Aldrich, Německo)

Chlazená centrifuga (Eppendorf, Německo)

Lyofilizátor Lyovac GT-2 (Leybold-Heraeus, Německo)

Magnetická míchačka (Biosan, Lotyšsko)

Mikrodestičkový spektrofotometr Power Wave XS (Biotek, USA)

Předvážky (Radwag Wagi Elektroniczne, Polsko)

Třepačka pro mikrodestičky (Biosan, Lotyšsko)

Vakuová vývěva D-lab (Edwards, USA)

Vortex (Biosan, Lotyšsko)

### 3.1.3 Biologický materiál

Studium funkce NO v rámci imunitních odpovědí včely medonosné bylo realizováno na včelách *A. mellifera*, které byly po jejich vylíhnutí krmeny pylem a 50% roztokem sacharosy (SACH) s/nebo bez přídavku modulátoru hladin NO (L-Arg, L-NAME). Modulátory hladin NO byly včelám podávány ve finální koncentraci 10 mmol·l<sup>-1</sup>. Včely byly takto rozděleny do 4 odlišně krmených skupin:

1. kontrolní skupina: 50% SACH
2. skupina: 50% SACH s přídavkem L-Arg (substrát NOS)
3. skupina: 50% SACH s přídavkem N- $\omega$ -nitro-L-argininmethylesterhydrochlorid (L-NAME; kompetitivní inhibitor NOS)
4. skupina: 50% SACH s přídavkem L-Arg a L-NAME

Po týdnu od vylíhnutí a krmení za uvedených podmínek byly včely imunizovány (vpich 1  $\mu$ l lipopolysacharidů (LPS) z bakterie *Escherichia coli* o koncentraci 1 mg·ml<sup>-1</sup>). Pro kontrolní skupiny každého treatmentu nebyla vždy polovina včel z každé skupiny imunizována. Po 24 hod od provedení imunizačního experimentu byly včely zamrazeny a uchovávány při -20 °C. Tyto vzorky připravila vedoucí mojí BP.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava vzorků včel

#### 3.2.1.1 Preparace trávicího traktu

Zamražené včely byly postupně rozmrazeny. Pomocí nůžek jim byla oddělena hlava a pomocí pinzety byl vypreparován trávicí trakt a medné volátko z každé včely. Tělní části včel byly po preparaci trávicího traktu přeneseny do plastové mikrozkušavky, zamrazeny v tekutém dusíku a pro další práci uchovány v mrazáku při -30 °C.

#### 3.2.1.2 Příprava včelích extraktů

Příprava zásobního extrakčního 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl pufru, pH 8

Navážka 605,7 mg Tris(hydroxyethyl)aminomethanu byla rozpuštěna v 200 ml dH<sub>2</sub>O. Pomocí koncentrované HCl bylo upraveno pH na hodnotu 8. Poté bylo přidáno 500  $\mu$ l Tritonu x-100 (0,2 % V/V). Následně byl roztok doplněn dH<sub>2</sub>O v odměrném válci na výsledný objem 250 ml. Extrakční pufr Tris-HCl byl uchován v zásobní láhvi v lednici.

### Příprava pracovního extrakčního 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl pufru, pH 8

Ve 20 ml extrakčního pufru Tris-HCl bylo rozpuštěno 6,2 mg DTT (2 mmol·l<sup>-1</sup>) a 4,8 mg AEBSF (1 mmol·l<sup>-1</sup>).

### Postup přípravy včelích extraktů pro stanovení RSNO

Mikrozkumavky s vypreparovanými včelami byly vytaženy z mrazáku a umístěny na led. Včely ve všech zkumavkách byly zváženy. Poté byly včely zhomogenizovány ve třecí misce pomocí tloučku v tekutém dusíku a byl k nim přidán extrakční pufr v poměru 1:4 (w/v). Po rozmělnění včel byl obsah třecí misky přenesen pomocí špachtličky do mikrozkumavky a pomocí vortexu byl obsah zkumavky promíchán. Mikrozkumavky byly ponechány 20 minut na ledu za občasného promíchání. Dále byl obsah mikrozkumavek centrifugován 20 min, 4 °C, 16 000x g. Po centrifugaci byl supernatant přepipetován do čistých mikrozkumavek a centrifugace byla zopakována (5 min, 4 °C, 16 000x g). Následně byl supernatant přepipetován do čistých mikrozkumavek. Připravené extrakty pro stanovení obsahu RSNO byly umístěny do mrazáku a uchovávány při – 20 °C.

### **3.2.1.3 Příprava vzorků z hemolymfy**

#### Příprava Coating pufru o pH 9,6

Navážky 1,272 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1,512 g NaHCO<sub>3</sub> byly rozpuštěny v 250 ml dH<sub>2</sub>O a pH bylo upraveno na 9,6 pomocí koncentrované HCl. Roztok byl doplněn na 300 ml a uchován při 4 °C.

#### Postup přípravy včelí hemolymfy pro stanovení AMP

Včela byla uchopena pomocí pinzety za hrudník. Malými nůžkami byl ustříhnut zadeček včely. Opatrným stlačením hrudníku byla vytlačena hemolymfa, ze které byly odebrány 2 µl pomocí 10µl pipety. Odebraná hemolymfa byla přenesena do 1,5ml eppendorfky do 0,1% kyseliny trifluoroctové (TFA) tak, aby byl zachován poměr 2 µl hemolymfy do 20 µl 0,1% TFA. Finální vzorek obsahoval hemolymfu z 5 včel (10 µl hemolymfy ve 100 µl 0,1% TFA). Množství hemolymfy v eppendorfce bylo zaznamenáno a vzorky byly připraveny k lyofilizaci. Vzorky se nechaly zamrazit při -80 °C alespoň na 2 h. Do víčka zkumavky byla pomocí špendlíku zhotovena dírka a vzorky byly zlyofilizovány. Lyofilizované vzorky byly rozpuštěny v 650 µl Coating pufru, pH 9,6.

Vzorky byly po intenzivním promíchání na vortexu umístěny na 15 min do ultrazvuku, poté znovu zvortexovány a krátce centrifugovány na stolní pikofuze. Vzorky hemolymfy jsem obdržela od vedoucí bakalářské práce.

### **3.2.2 Stanovení hladiny S-nitrosothiolů Savillovou metodou**

#### **3.2.2.1 Zásobní roztoky pro Savillovu metodu**

##### Zásobní roztok činidla A

Navážka 3,5 g sulfanilamidu byla rozpuštěna v 0,5 mol·l<sup>-1</sup> HCl a roztok byl doplněn na výsledný objem 100 ml.

##### Zásobní roztok činidla B

Navážky 3,5 sulfanilamidu a 1 g HgCl<sub>2</sub> byly rozpuštěny v 0,5 mol·l<sup>-1</sup> HCl a roztok byl doplněn na výsledný objem 100 ml.

##### Zásobní roztok činidla NED

Navážka 0,1 g N-(1-naftyletylen)diaminu byla rozpuštěna v deionizované vodě (dH<sub>2</sub>O) a roztok byl doplněn na výsledný objem 100 ml.

##### Roztok 0,5 mol·l<sup>-1</sup> HCl pro přípravu činidel A a B

Objem 8,6 ml 36% HCl (11,6 M) o byl smíchán s dH<sub>2</sub>O a roztok byl doplněn na výsledný objem 200 ml.

##### Roztok 0,5 mol·l<sup>-1</sup> HCl pro přípravu GSNO

Objem 217 µl 36% HCl (11,6 mol·l<sup>-1</sup>) byl smíchán s dH<sub>2</sub>O a roztok byl doplněn na výsledný objem 5 ml.

##### Syntéza S-nitrosoglutathionu

Navážka 614 mg glutathionu (GSH) byla rozpuštěna ve 3 ml o koncentraci 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> HCl. Vzniklý roztok byl chlazen na ledové lázni. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce a současného chlazení na ledové lázni bylo ke směsi přidáno 138,1 mg NaNO<sub>2</sub>. Směs byla 40 minut ponechána za stálého míchání na ledové lázni. Po 40 minutách byla vzniklá červená sraženina S-nitrosoglutathionu (GSNO) odsáta na filtračním papíře umístěném v Büchnerově nálevce. Následně bylo GSNO na filtračním papíře 2x promyto 10 ml ledově vychlazenou dH<sub>2</sub>O, 2x 10 ml ledově vychlazeným acetonem a 2x 10 ml ledově vychlazeným diethyletherem. Odsátá sraženina



byla přemístěna z filtračního papíru do plastové mikrozkušavky obalené alobalem, který chránil GSNO před světlem. Zkušavka s GSNO byla umístěna do exsikátoru, ze kterého byl pomocí vakuové pumpy odsát vzduch. GSNO se ponechalo sušit 30 min v exsikátoru. Poté byl GSNO v plastové zkušavce obalené alobalem zamražen a uchováván při -20 °C.

#### Standardy S-nitrosoglutathionu

Navážka 3,37 mg nasyntetizovaného GSNO byla rozpuštěna v 1,002 ml dH<sub>2</sub>O, takto byl získán 10 mmol·l<sup>-1</sup> roztok GSNO. Roztok byl promíchán na vortexu. Po promíchání byla mikrozkušavka s 10 mmol·l<sup>-1</sup> roztokem GSNO zabalena do alobalu (ochrana před světlem) a umístěna na led. Roztok GSNO o koncentraci 10 mmol·l<sup>-1</sup> byl použit pro přípravu kalibrační řady roztoků GSNO o koncentracích 25; 50; 75; 100; 250; 500; 750 a 1000 μmol·l<sup>-1</sup> (Tab. 1).

Tab. 1 Objemy zásobního 10 mmol·l<sup>-1</sup> roztoku GSNO a dH<sub>2</sub>O pro přípravu standardních roztoků GSNO pro sestavení kalibrační přímky.

Koncentrace GSNO [μmol·l <sup>-1</sup> ]	Objem 10 mmol·l <sup>-1</sup> roztoku GSNO [μl]	Objem dH <sub>2</sub> O [μl]
25	2,5	997,5
50	5	995
75	7,5	992,5
100	10	990
250	25	975
500	50	950
750	75	925
1000	100	900

### **3.2.2.2 Stanovení RSNO Savillovou metodou**

Do jamek na mikrotitrační destičce bylo nejprve napipetováno 5  $\mu\text{l}$  blanku (pro standardy  $\text{dH}_2\text{O}$ , pro včelí extrakty Tris-HCl extrakční pufr), standardu GSNO v koncentračním rozpětí od 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  do 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Tab. 1) nebo včelího extraktu. Každý vzorek byl pipetován v hexaplikátu. Do technického triplikátu pro každý vzorek bylo přidáno 195  $\mu\text{l}$  činidla A a do druhého triplikátu bylo přidáno 195  $\mu\text{l}$  činidla B. Obsah jamek byl inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo ke všem vzorkům přidáno 100  $\mu\text{l}$  činidla NED. Poté opět proběhla inkubace 5 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubace byla změřena absorbance vzorků na spektrofotometrickém mikrodestičkovém readeru (Power Wave XS, BioTek) při vlnové délce 540 nm za laboratorní teploty. Stanovení bylo provedeno ve 4 opakováních.

### **3.2.2.1 Stanovení proteinů Bradfordovou metodou**

#### **3.2.2.3 Zásobní roztoky pro Bradfordovu metodu**

##### Zásobní roztok Coomasie Blue

Zásobní roztok Coomasie Blue byl připraven rozpuštěním 50 mg Coomasie Blue G250 ve 25 ml methanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné a doplněním  $\text{dH}_2\text{O}$  na výsledný objem 100 ml.

##### Pracovní roztok Bradfordova činidla

Před vlastním měřením byl připraven vždy čerstvý pracovní roztok Bradfordova činidla, a to zředěním zásobního roztoku Coomasie Blue v  $\text{dH}_2\text{O}$  v poměru 1:4.

##### Zásobní roztok hovězího albuminu (BSA) o koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

50 mg hovězího albuminu bylo rozpuštěno v 0,5 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  a promícháno na vortexu.

##### Standardy BSA

Připravený zásobní roztok BSA o koncentraci 10  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  byl použit pro přípravu kalibrační řady roztoků BSA o koncentracích 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Tab. 2).

Tab. 2 Objemy zásobního roztoku BSA o koncentraci 10 mg·ml<sup>-1</sup> a dH<sub>2</sub>O pro přípravu standardních roztoků BSA pro sestavení kalibrační přímky.

Koncentrace BSA [mg·ml <sup>-1</sup> ]	Objem zásobního roztoku BSA o koncentraci 10 mg·ml <sup>-1</sup> [μl]	Objem dH <sub>2</sub> O [μl]
0,05	5	995
0,1	10	990
0,2	20	980
0,4	40	960
0,6	60	940
0,8	80	920
1	100	900

### 3.2.2.4 Vlastní postup měření

Do jamek na mikrotitrační destičce bylo nejprve napipetováno 45 μl dH<sub>2</sub>O. Poté bylo přidáno 5 μl blanku (pro standardy voda, pro včelí extrakty příslušný extrakční pufr), nebo standardu, nebo včelího extraktu. Vzorky blanku, standardu i včelí extrakty byly na destičku pipetovány v triplikátech. Následně bylo přidáno do každé jamky 200 μl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Destička byla jemně protřepána a nechala se inkubovat po dobu 5 min. Po uplynutí inkubace byla změřena absorbance vzorků při 595 nm na spektrofotometrickém mikrodestičkovém readeru (Power Wave XS, BioTek).

### 3.2.3 Stanovení hladiny vybraných AMP (Aba, Hym, Def-1) nepřímou ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) metodou

#### 3.2.3.1 Zásobní roztoky pro nepřímou ELISA metodu

##### Promývací pufr pro použití

Navážky 4,382 g NaCl, 0,208 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O a 0,074 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> byly rozpuštěny ve 400 ml dH<sub>2</sub>O. Hodnota pH vzniklého roztoku byla upravena na 7,5 (NaOH), bylo přidáno 500 μl Tween-20 a roztok byl doplněn do 500 ml. Promývací pufr byl uchováván při 4 °C.

##### Blokovací roztok

Navážka 0,25 g mléka byla rozpuštěna v promývacím pufru a roztok byl doplněn na 50 ml.

##### 0,5 mol·l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Objem 134 μl 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> byl smísen s 4,866 ml dH<sub>2</sub>O.

### **3.2.3.2 Příprava ELISA substrátu**

#### 0,2 mol·l<sup>-1</sup> hydrogenfosforečnan sodný

Navážka 1,78 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O byla rozpuštěna v dH<sub>2</sub>O a roztok byl doplněn na 50 ml. Roztok byl uchováván při 4 °C.

#### 0,1 mol·l<sup>-1</sup> kyselina citronová

Navážka 2,1 g monohydrátu kyseliny citronové byla rozpuštěna v dH<sub>2</sub>O a doplněna na 100 ml. Roztok byl uchováván při 4 °C.

#### Fosfo-citrátový pufr s perborátem sodným pH 4,6

Objem 24 ml 0,2 mol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> byl smíchán s 26 ml 0,1 mol·l<sup>-1</sup> kyseliny citronové. Hodnota pH roztoku byla upravena na 4,6. Následně bylo k roztoku přidáno 0,02 g perborátu sodného. Roztok byl uchováván při 4 °C v polyethylenové nádobě.

#### 100 mmol·l<sup>-1</sup> roztok TMB

Navážka 24 mg 3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidinu (TMB) byla rozpuštěna v 1 ml DMSO. Roztok byl uchováván při 4 °C ve tmě.

#### ELISA substrát k použití

Fosfo-citrátový pufr s perborátem sodným pH 4,6 o objemu 1 ml byl smíchán s 25 µl 100 mmol·l<sup>-1</sup> TMB (ředění v poměru 1:40). Roztok byl uchováván ve tmě při 4 °C.

### **3.2.3.3 Vlastní postup měření**

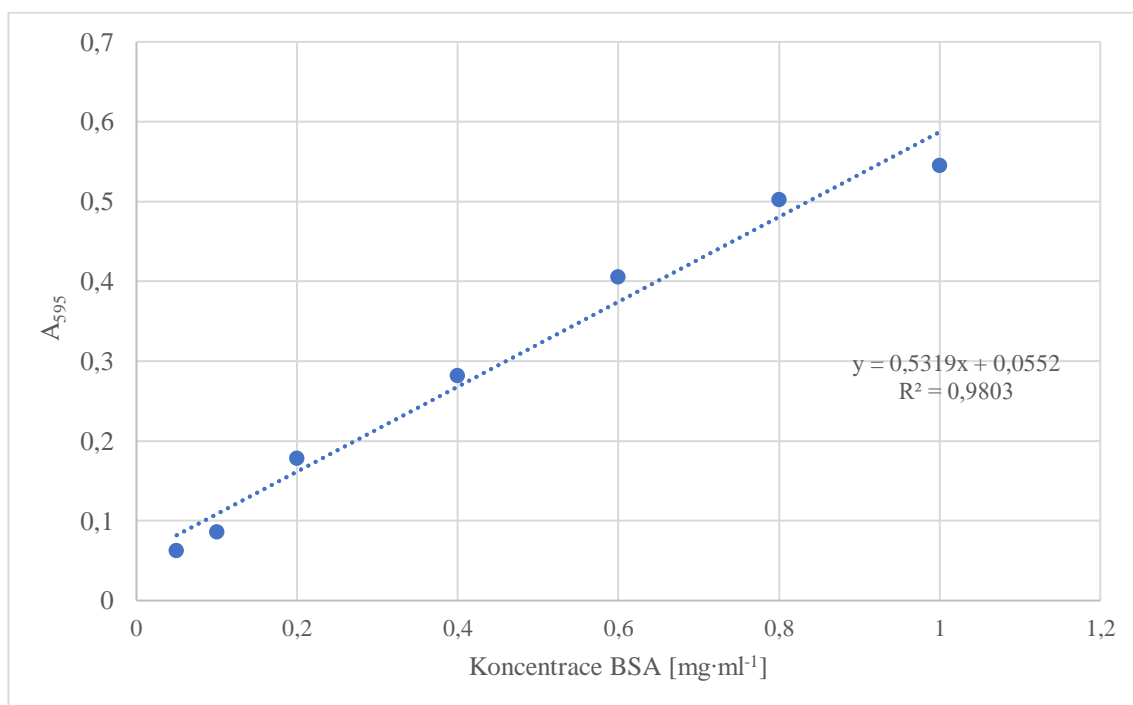
Do každé jamky ELISA destičky bylo přidáno 100 µl supernatantu obsahujícího Coating pufr a hemolymfu. Každý vzorek byl pipetován v duplikátu pro každý peptid. V případě blanku bylo pipetováno pouze 100 µl Coating pufru. Jako pozitivní kontrola byl použit standard daného AMP o koncentraci 20 ng·ml<sup>-1</sup>. Destička byla přikryta víčkem a obtáhnuta parafilmem. Poté proběhla inkubace přes noc při 4 °C, aby se antigen navázal na ELISA destičku. Následující den byly vzorky vytřepány z jamek a destičky byly vysušeny poklepáním na ubrousek. Následně byly všechny jamky promyty promývacím pufrům. Do každé jamky bylo napipetováno 200 µl promývacího pufru. Každá jamka byla 7x promíchána pomocí pipety. Promývací pufr byl vytřepán z jamek. Promývání se opakovalo ještě 2x. Na závěr byl řádně vytřepán zbývající promývací pufr z jamek.

Do každé jamky bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  blokovacího roztoku. Destička byla přikryta víčkem, které bylo obtaženo parafilmem, a proběhla inkubace 2 h při 37 °C za mírného třepání. Po inkubaci byly vzorky vytřepány z jamek, destička byla vysušena poklepáním na ubrousek a opět byly promyty všechny jamky stejným způsobem, jaký byl výše popsán. Po promytí jamek a řádném vytřepání promývacího pufru z jamek bylo do každé jamky přidáno 100  $\mu\text{l}$  naředěné primární protilátky (Clonostar: primární králičí polyklonální protilátka proti Aba, Def-1 a Hym). Primární protilátka byla ředěna v pracovním promývacím pufru. Ředění pro jednotlivé AMP bylo následující: 1:500 pro Def-1; 1:250 pro Aba; 1:500 pro Hym. Destička byla opět přikryta víčkem, které bylo obtaženo parafilmem. Následně proběhla inkubace 1 h při 37 °C za jemného třepání. Před koncem inkubace byl z lednice vytažen roztok 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TBM. Roztok musel být před ředěním minimálně 1 h při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly vzorky opět vytřepány a jamky byly promyty promývacím pufrům. Po promytí jamek a důkladném vytřepání promývacího pufru z jamek bylo do každé jamky přidáno 100  $\mu\text{l}$  sekundární protilátky (Sigma-Aldrich, sekundární anti-králičí Ab) konjugované s křenovou peroxidasou, která byla ředěna v poměru 1:3000. Poté proběhla inkubace 1 h při 37 °C za jemného třepání. Během inkubace byl připraven substrát pro ELISU (viz kapitola 3.2.3.2). Substrát bylo nutné připravit minimálně 1 h před použitím. Po inkubaci byly vzorky vytřepány z jamek, destička byla vysušena poklepáním na ubrousek. Poté byly jamky 3x promyty způsobem popsaným výše. Pufr byl z jamek řádně vytřepán. Do jamek bylo následně přidáno 100  $\mu\text{l}$  substrátu pro ELISU. Poté proběhla inkubace ve tmě 1 h při 37 °C za jemného třepání. Po uplynutí doby inkubace byla reakce zastavena přidáním 50  $\mu\text{l}$  0,5  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Na spektrofotometrickém mikrodestičkovém readeru Power Wave XS byla změřena absorbance při 450 nm.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Stanovení proteinů Bradfordovou metodou

Na spektrofotometrickém mikrodestičkovém readeru Power Wave XS byly při vlnové délce 595 nm naměřeny absorbance standardních roztoků BSA o koncentracích v rozpětí od  $0,05 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  do  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , dále pak byla při 595 nm proměřena absorbance včelích extraktů. Z hodnot absorbance standardních roztoků BSA byl sestaven graf kalibrační křivky BSA pro stanovení obsahu celkových proteinů Bradfordovou metodou (Obr. 3).

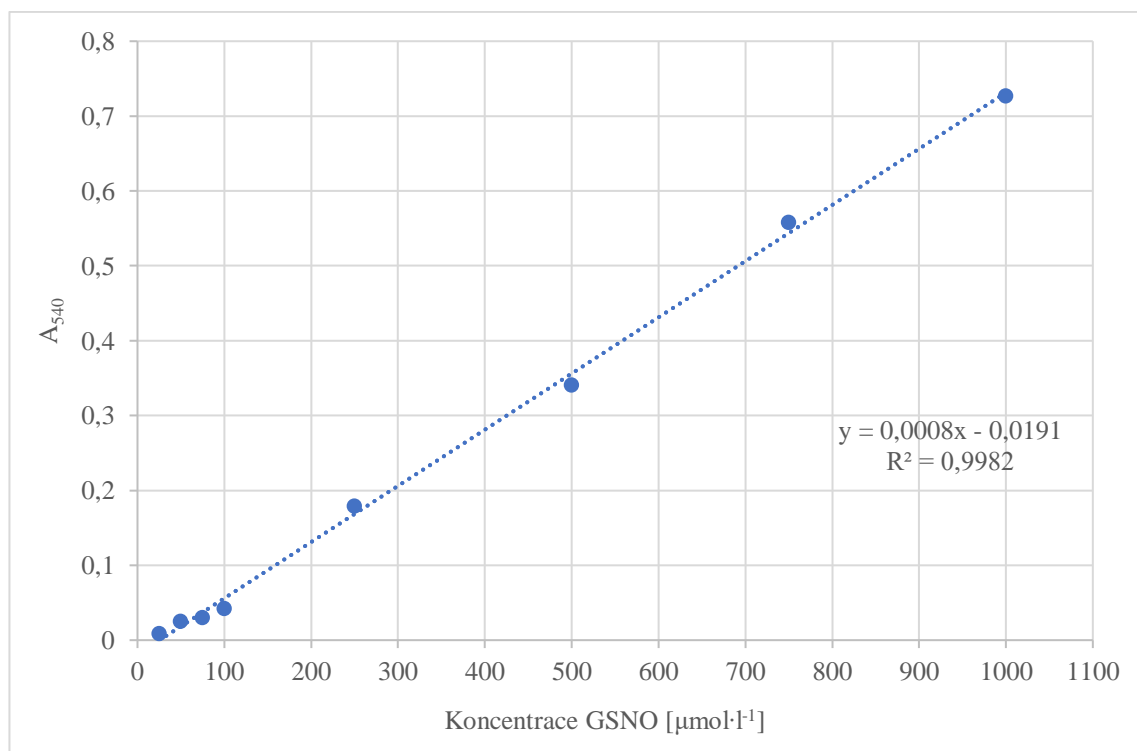


Obr. 3 Kalibrační křivka BSA.

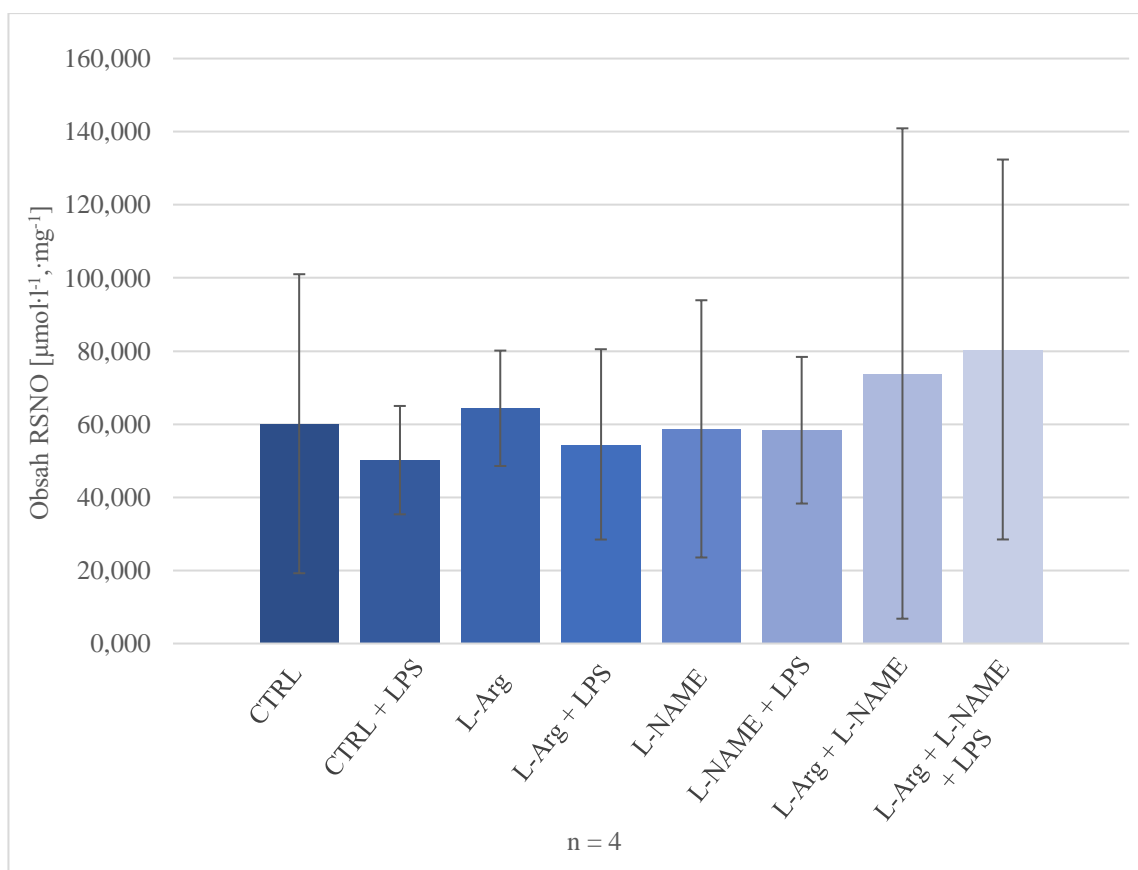
Rovnice kalibrační křivky má tvar  $y = 0,5319x + 0,0552$  s intervalem spolehlivosti  $R^2 = 0,9803$ . Dosazením naměřených hodnot absorbance při 595 nm analyzovaných včelích extraktů do této rovnice byla vypočítána koncentrace proteinů v těchto extraktech, která byla použita ke vztažení obsahu RSNO v analyzovaných vzorcích na mg proteinu.

#### 4.2 Stanovení hladiny RSNO Savillovou metodou

Z hodnot absorbance standardních roztoků GSNO v rozpěi 25 až 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  při vlnové délce 540 nm byla sestavena kalibrační křivka GSNO pro Savillovu metodu (Obr. 4). Rovnice kalibrační křivky má tvar  $y = 0,0008x - 0,0191$  s intervalem spolehlivosti  $R^2 = 0,9982$ . Dosazením hodnot absorbance při 540 nm příslušných extraktů do této rovnice byla vypočítána koncentrace RSNO v těchto extraktech, která byla následně vztažena na 1 mg proteinu (Obr. 5).



Obr. 4 Kalibrační křivka GSNO.



Obr. 5 Obsah RSNO ve včelích extraktech včel lišících se v krmení a imunizaci vztažená na jednotkovou koncentraci proteinů ve vzorcích. CTRL = skupina krmená SACH. CTRL + LPS = skupina krmená SACH a imunizovaná LPS. L-Arg = skupina krmená SACH a L-Arg; L-Arg + LPS = skupina krmená SACH a L-Arg a imunizovaná LPS. L-NAME = skupina krmená SACH a L-NAME. L-NAME + LPS = skupina krmená SACH a L-NAME imunizovaná LPS. L-Arg + L-NAME = skupina krmená SACH a L-Arg a L-NAME; L-Arg + L-NAME + LPS = skupina krmená SACH a L-Arg a L-NAME imunizovaná LPS. Stanovení bylo provedeno pro 4 biologické replikáty. Z hodnot obsahu RSNO byl vypočten aritmetický průměr a SD.

Hladiny NO mají u hmyzu vliv na produkci AMP během imunitní odezvy způsobené přítomností patogenního organismu. To bylo prokázáno např. ve studii s blýskavkou červivcovou (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018), bourcem dubovým (Liu et al., 2020) a octomilkou obecnou (Davies & Dow, 2009). Vzhledem k této skutečnosti byla nejprve stanovena hladina NO. V příslušných včelích extraktech však nebyla stanovována přímo buněčná hladina NO, protože se jedná o poměrně reaktivní molekulu (Lundberg & Weitzberg, 2010), namísto toho byla v daných vzorcích stanovena hladina jeho zásobní a transportní formy – RSNO (Broniowska et al., 2013).



Krmení potravou obohacenou o různé modulatory NO (L-Arg, L-NAME) u včel by mělo vést ke změnám hladiny NO u jednotlivých skupin včel. Obohacení potravy o L-Arg by mělo hladinu NO zvyšovat, protože se jedná o substrát NOS, která se podílí na produkci NO z L-Arg (Davies, 2000). Krmení s přídavkem L-NAME by naopak mělo hladinu NO snižovat, protože L-NAME je strukturním analogem L-Arg, který inhibuje NOS. Krmení L-Arg i L-NAME by mělo vést k vyšším hladinám NO, případně hladinám NO srovnatelným s kontrolní skupinou krmenou SACH. L-NAME inhibuje produkci NO prostřednictvím NOS, pokud se ale přidá v nadbytku L-Arg, který je substrátem NOS, mělo by dojít ke zrušení inhibičního účinku L-NAME, protože L-Arg kompetuje s L-NAME o vazbu do aktivního místa NOS (Davies, 2000, Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018).

Za imunizačních podmínek se předpokládá, že hladiny NO u imunizovaných včel budou vyšší než u neimunizovaných včel, protože stimulace imunitního systému vede k indukci zvýšené produkce NO prostřednictvím NOS (Foley & O'Farrell, 2003, Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). Hladina zásobních a transportních forem NO, tedy RSNO, u kontrolní skupiny krmené pouze SACH, skupiny krmené s přídavkem L-Arg a skupiny krmené s přídavkem L-Arg+L-NAME měla být po imunizaci vyšší než u skupiny krmené s přídavkem L-NAME, protože L-NAME by měl snižovat produkci NO inhibicí NOS. Nicméně u včel krmených s přídavkem L-NAME by po imunizaci mohlo dojít k navýšení hladiny NO a tedy i jeho zásobních forem, protože aktivita NOS by nemusela být zcela inhibována (Broniowska et al., 2013, Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018).

Nejvyšší obsah RSNO (Obr. 5) byl pozorován u imunizovaných včel krmených L-Arg a L-NAME, což odpovídá předpokladům, kdy imunizace indukovala zvýšenou produkci NO prostřednictvím NOS a rovněž L-Arg zrušil inhibiční účinek L-NAME (Davies et al., 2000, Foley & O'Farrell, 2003).

Druhý nejvyšší obsah RSNO (Obr. 5) byl stanoven v extraktu získaného z neimunizovaných včel krmených L-Arg a L-NAME. Hladina RSNO u této skupiny byla však ve srovnání se skupinou imunizovaných včel se stejným krmením nižší, což odpovídá teoretickému předpokladu, protože imunizace by měla stimulovat produkci NO prostřednictvím NOS. Inhibiční účinek L-NAME je v tomto případě rušen přídavkem

L-Arg (Davies et al., 2000, Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). Hladina NO u této skupiny včel byla nejvyšší v porovnání se zbylými neimunizovanými skupinami včel.

Nižší hladiny RSNO (Obr. 5) byly stanoveny u neimunizovaných včel z kontrolní skupiny krmené SACH a ze skupiny včel krmených s přídavkem L-Arg. Tyto hladiny byly téměř srovnatelné. Nicméně hladina RSNO u skupiny krmené s přídavkem L-Arg měla být vyšší než u kontrolní skupiny krmené SACH, protože L-Arg je substrátem NOS, prostřednictvím které je produkován NO. Pro dosažení výraznějšího rozdílu v hladinách RSNO mezi neimunizovanou kontrolní skupinou krmenou SACH a neimunizovanou skupinou krmenou s přídavkem L-Arg by bylo vhodné použít vyšší koncentrace L-Arg pro krmení včel (Davies et al., 2000). Navíc u těchto skupin byl velký rozptyl hodnot, proto by bylo vhodné případný vliv biologické diverzity na získaná data eliminovat provedením experimentu na více jedincích.

Méně RSNO (Obr. 5) dále obsahovaly skupiny imunizovaných i neimunizovaných včel krmených L-NAME. U obou skupin byla hladina RSNO téměř srovnatelná. To odpovídá předpokladu, že produkce NO prostřednictvím NOS by měla být inhibována L-NAME, nicméně hladiny RSNO nebyly příliš odlišné od hladiny RSNO u neimunizovaných včel z kontrolní skupiny krmené SACH. Což značí, že použité koncentrace L-NAME byly dostatečné pro inhibici produkce NO prostřednictvím NOS, protože nedošlo ke zvýšené produkci NO vlivem imunizace, ke kterému v organismu dochází bez inhibice NOS (Foley & O'Farrell, 2003, Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). U této skupiny byl také pozorován velký rozptyl hodnot, proto by bylo vhodné pro získání přesnějších dat provést experiment na více včelách, aby se eliminoval vliv biologické diverzity na stanovované hladiny RSNO.

Nejnižší obsah RSNO (Obr. 5) se vyskytoval u skupin imunizovaných včel z kontrolní skupiny krmené SACH a ze skupiny krmené s přídavkem L-Arg. U těchto skupin se předpokládalo, že hladina RSNO bude vyšší u skupiny krmené s přídavkem L-Arg, protože L-Arg je substrátem NOS, prostřednictvím které dochází k produkci NO (Davies et al., 2000). Malý rozdíl mezi hladinami RSNO u imunizované kontrolní skupiny krmené SACH a imunizované skupiny krmené s přídavkem L-Arg lze zdůvodnit použitím nízkých koncentrací L-Arg, které výrazně neovlivnily produkci NO prostřednictvím NOS. Dalším možným vysvětlením je, že NO, jakožto signální molekula v rámci imunitní odpovědi hostitelského organismu, nebyl v buňce skladován ve formě RSNO, ale naopak byl

zapojen do dalších signálních pochodů (Negri et al., 2014). U imunizovaných skupin (kontrolní skupiny krmené SACH i skupiny s přídavkem L-Arg) se očekávalo, že bude hladina NO vyšší, protože došlo ke stimulaci imunitního systému, což vede ke zvýšené produkci NO prostřednictvím NOS (Foley & O'Farrell, 2003), ovšem zde lze pozorovat opačný trend. Odlišné výsledky lze zdůvodnit tím, že NO nebyl v organismu skladován ve formě RSNO, ale účastnil signalizace v rámci imunitních drah hostitelského organismu (Broniowska et al., 2013, Negri et al., 2014). Dalším možným vysvětlením je biologická diverzita včel, protože mezi stanovenými hladinami RSNO byl velký rozptyl. Vliv biologické diverzity na získaná data by bylo možné eliminovat provedením experimentu na větším počtu včel.

Vliv L-Arg a L-NAME na hladinu RSNO u neimunizovaných včel byl nevýznamný (Obr. 5). To může naznačovat, že použité hladiny L-Arg a L-NAME byly příliš nízké na to, aby ovlivnily buněčnou hladinu NO, proto by bylo vhodné v rámci příštích experimentů určit koncentrace modulátorů hladin NO tak, aby dostatečně ovlivňovaly hladiny NO a zároveň nepoškozovaly organismus. NO se v organismu nevyskytuje pouze ve formě RSNO, proto by bylo vhodné stanovit přímo hladinu NO, popřípadě jeho metabolitů dusičnanů a dusitanů (Liu et al., 2020, Herrera-Ortiz et al., 2011). Mezi stanovenými hodnotami RSNO byl velký rozptyl, což mohlo být způsobeno biologickou variabilitou jednotlivých včel. Vliv biologické variability lze eliminovat provedením experimentu ve více replikátech.

Imunizace včel neměla na pozorované hladiny RSNO téměř žádný dopad (Obr. 5). NO se však v rámci imunitní odpovědi mohl podílet na signalizaci v rámci imunitních drah i na samotnou interakci s cizorodými částicemi, a proto nedošlo k jeho ukládání ve formě RSNO (Negri et al., 2014, Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018).

U včely medonosné zatím nebyla provedena žádná studie zahrnující sledování vlivu modulátorů hladiny NO na buněčnou hladinu NO. Modulátory hladin NO mají vliv na buněčné hladiny např. u blýskavky červivcové (Sadekuzzaman & Kim, 2018) i u bource dubového (Liu et al., 2020). L-NAME i L-Arg by tedy měly ovlivňovat buněčnou hladinu NO i u včely medonosné. L-NAME je inhibitorem NOS, proto by měl jeho přídavek snížit buněčné hladiny NO (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). Naopak přídavek L-Arg by měl buněčné hladiny NO zvýšit, protože je substrátem NOS, která zprostředkovává produkci NO (Davies et al., 2000). Z výše uvedeného vyplývá, že pro

provedený experiment byly pravděpodobně zvoleny nízké koncentrace L-NAME a L-Arg pro krmení včel. V rámci příštích experimentů by tedy bylo vhodné koncentrace použitých modulátorů hladiny NO navýšit.

Pro příští studie by bylo rovněž vhodné pro komplexní pohled na buněčné hladiny NO provést i stanovení NO, případně jiných metabolitů NO, než pouze RSNO, jako jsou dusitany a dusičnany, které byly stanovovány Griessovou metodou např. ve studiích s bourcem dubovým (Liu et al., 2020) a octomilkou (Herrera-Ortiz et al., 2011), nebo pouze dusitanů v případě blyskavky červivcové (Sadekuzzaman & Kim, 2018).

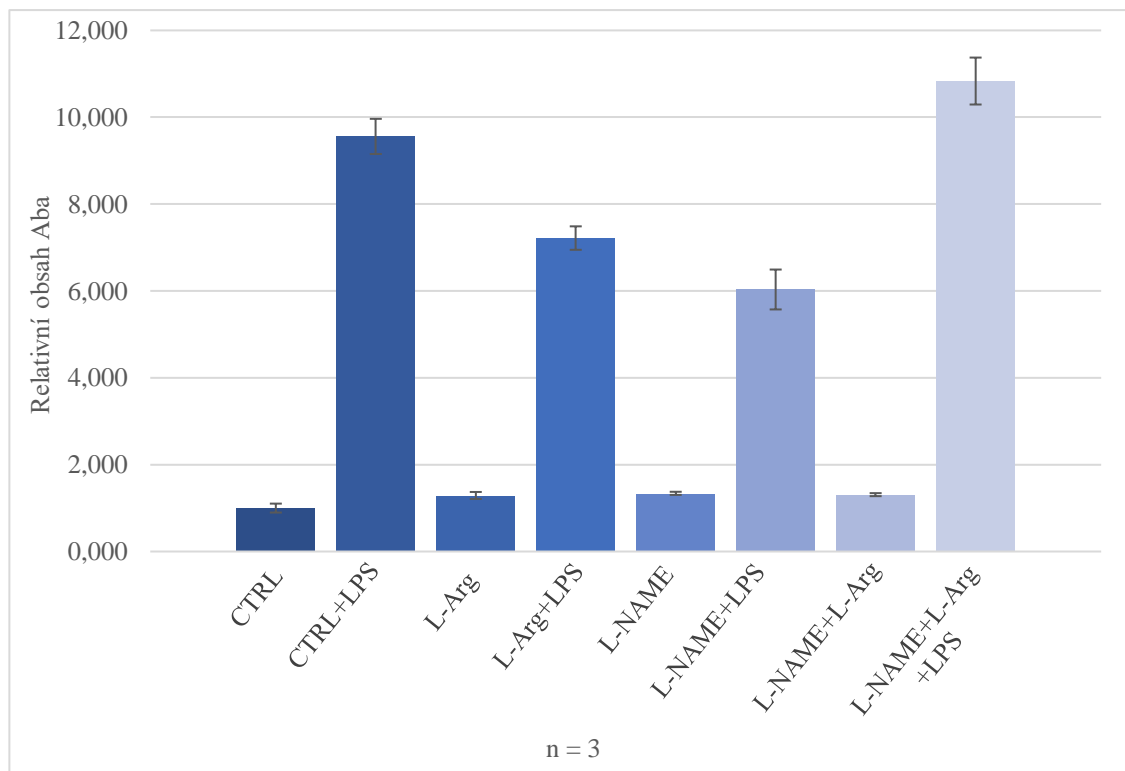
### **4.3 Stanovení hladiny AMP nepřímou ELISA metodou**

Pro stanovení hladiny vybraných AMP (Aba, Def-1, Hym) byla použita nepřímá ELISA s využitím primárních protilátek specifických pro zkoumané AMP. Detekce a následné vyhodnocení obsahu jednotlivých AMP bylo realizováno na základě analýzy finálního produktu reakce ve vzorcích v rámci provedené nepřímé ELISA metody, a to spektrofotometrickou analýzou při 450 nm. Obsah AMP ve vzorcích byl vyhodnocen relativně vztažením hladiny daného AMP k jeho množství v kontrolní skupině krmené SACH, která nebyla podrobena imunizaci.

U všech vybraných AMP (Aba, Def-1, Hym) se předpokládalo, že jejich hladina před imunizací bude na bazální hladině, protože AMP jsou ve zvýšené míře produkovány až po stimulaci imunitního systému včel. U všech skupin včel, které byly podrobeny imunizaci, by měl NO stimulovat vyšší produkci AMP. Výjimkou je u skupiny imunizovaných včel skupina krmená L-NAME, u které by měly být hladiny AMP nižší než u zbylých imunizovaných skupin, protože L-NAME inhibuje produkci NO prostřednictvím NOS. Nicméně byly očekávány vyšší hladiny daných AMP než u stejné skupiny včel, které nebyly imunizovány, protože indukce genové exprese AMP a tvorba AMP není závislá pouze na hladině NO (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). U Hym se po imunizaci předpokládá nejvyšší hladina AMP, protože je specifický pro  $G^-$  bakterie, protože pro imunizaci v rámci této bakalářské práce byly použity lipolysacharidy z  $G^-$  bakterie *E. coli*. K produkci Aba a Def-1 dochází v odpovědi hostitelského organismu jak na  $G^-$ , tak  $G^+$  bakterií (Jefferson et al., 2013, Danihlík et al., 2016).

V případě Aba (Obr. 6) neměla potrava obohacená na modulátory NO u včel, které nepodlehly imunizaci, vliv na produkci Aba. U všech skupin neimunizovaných včel byla hladina Aba nízká a její hladiny byly přibližně stejné. To odpovídá i předpokladu, kdy

by se produkce ABA neměla zvýšit, protože nedošlo ke stimulaci imunitního systému a s tím spojené indukci produkce NO NOS (Daníhlík et al., 2016, Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). Po imunizaci došlo u všech skupin včel k výraznému zvýšení hladiny ABA. To odpovídá předpokladu, že stimulaci imunitního systému by mělo dojít k indukci produkce AMP (Daníhlík et al., 2016). Nejvyšší hladina ABA byla zaznamenána u imunizovaných včel krmených L-Arg + L-NAME. Zde bylo očekáváno zvýšení produkce ABA po imunitním stimulu, protože NO mělo být NOS produkováno ve zvýšené míře, což by napomohlo ke zvýšené produkci ABA (Davies et al., 2000, Foley & O'Farrell, 2003). Následovala kontrolní skupina krmená SACH imunizovaná LPS, u které se rovněž předpokládalo zvýšení produkce ABA po stimulaci imunitního systému (Daníhlík et al., 2016). Nižší obsah abaecinu se vyskytoval u skupiny imunizovaných včel krmených L-Arg. Tato skupina obsahovala méně ABA než kontrolní imunizovaná skupina krmená SACH, což odporuje teoretickým předpokladům, že L-Arg by měl spíše vést k vyšší produkci ABA, protože zvyšuje hladiny NO. Tato neshoda může být způsobena nízkou koncentrací L-Arg použitou při krmení včel. Nejnižší hladina ABA byla zaznamenána u skupiny včel krmených s přídavkem L-NAME. V tomto případě se očekávaly hladiny ABA nižší ve srovnání s jinými imunizovanými skupinami, protože L-NAME má negativní vliv na produkci NO inhibicí NOS, avšak oproti neimunizovaným včelám z téže skupiny se mohla produkce ABA zvýšit, protože produkce NO prostřednictvím NOS nemusela být kompletně inhibována (Foley & O'Farrell, 2003, Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018).



Obr. 6 Relativní obsah Aba ve vzorcích hemolymfy imunizovaných a neimunizovaných včel s odlišným kmením. Hladině Aba u kontrolní skupiny byla přiřazena hodnota 1. CTRL = skupina krmená SACH. CTRL + LPS = skupina krmená SACH a imunizovaná LPS. L-Arg = skupina krmená SACH a L-Arg; L-Arg + LPS = skupina krmená SACH a L-Arg a imunizovaná LPS. L-NAME = skupina krmená SACH a L-NAME. L-NAME + LPS = skupina krmená SACH a L-NAME imunizovaná LPS. L-Arg + L-NAME = skupina krmená SACH a L-Arg a L-NAME; L-Arg + L-NAME + LPS = skupina krmená SACH a L-Arg a L-NAME imunizovaná LPS. Stanovení bylo provedeno pro 3 biologické replikáty. Z hodnot obsahu Aba byl vypočten aritmetický průměr a SD.

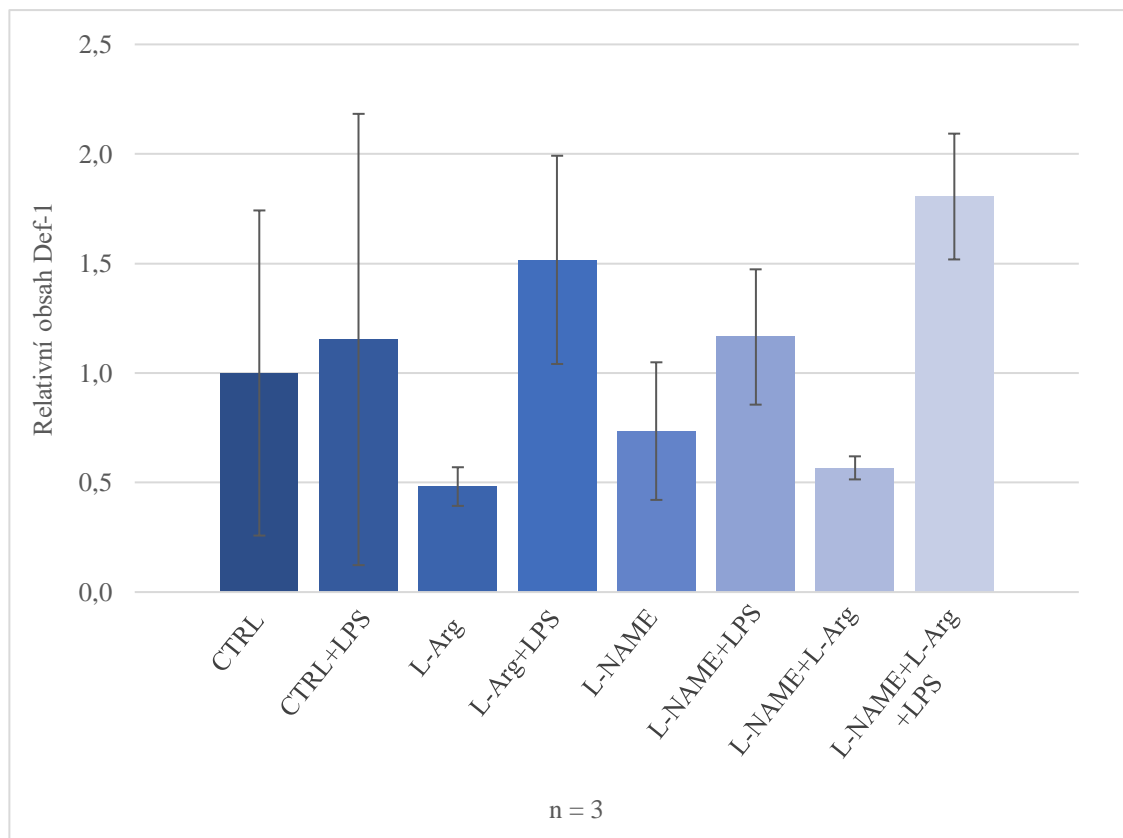
U Def-1 (Obr. 7) byly pozorovány nejnižší hladiny u neimunizovaných včel, což odpovídá předpokladu, že bez stimulace imunitního systému by nemělo dojít ke zvýšené produkci Def-1 (Daníhlík et al., 2016). Nejvyšší obsah Def-1 u neimunizovaných včel byl zaznamenán u neimunizované kontrolní skupiny krmené SACH. Následovala skupina neimunizovaných včel krmených L-NAME, poté skupina neimunizovaných včel krmených L-NAME + L-Arg a nejnižší obsah Def-1 se vyskytoval u skupiny neimunizovaných včel krmených L-Arg. Hladiny Def-1 u neimunizovaných včel se mezi skupinami lišily, ačkoliv by u všech neimunizovaných včel měly být hladiny Def-1 přibližně stejné, protože nedošlo ke stimulaci imunitního systému, a tedy by nemělo dojít ani ke zvýšené produkci Def-1, který je ve zvýšené míře produkován právě během imunitní odpovědi (Daníhlík et al., 2016, Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). Produkce Def-1 mohla být ovlivněna modulátory NO. U skupiny neimunizovaných včel krmených s přídavkem L-NAME došlo ke snížení hladiny Def-1 oproti neimunizovaným včelám z kontrolní skupiny krmené SACH. L-NAME zde pravděpodobně inhiboval NOS, což vedlo ke snížení buněčné hladiny NO a v konečném důsledku ke snížení produkce Def-1 (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). Krmení s přídavkem L-Arg i krmení s přídavkem L-Arg a L-NAME nemělo vliv na produkci Def-1, protože u těchto skupin byly hladiny Def-1 nižší než u neimunizované kontroly. Odlišné hladiny Def-1 u těchto skupin lze vysvětlit biologickou variabilitou jednotlivých včel.

Imunizace včel způsobila u všech skupin nárůst hladiny Def-1 (Obr. 7), což odpovídá předpokladu, že produkce Def-1 by se měla zvýšit v závislosti na imunitním stimulu (Daníhlík et al., 2016, Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). Nejvyšší hladinu Def-1 obsahoval skupina imunizovaných včel ze skupiny krmené L-Arg + L-NAME. To odpovídá předpokladu, že inhibice NOS prostřednictvím L-NAME může být vyrušena přídavkem L-Arg, a tedy by se produkce NO prostřednictvím NOS v závislosti na imunitním stimulu mohla zvýšit, což by následně napomohlo ke zvýšení produkce Def-1 (Davies et al., 2000, Foley & O'Farrell, 2003).

Nižší hladina Def-1 se nacházela u skupiny imunizovaných včel krmených L-Arg (Obr. 7). To nesplňuje očekávání, protože včely z této skupiny byly krmeny s přídavkem L-Arg, což je substrát NOS (Davies et al., 2000, Foley & O'Farrell, 2003). V případě, že došlo u této skupiny ke stimulaci imunitního systému, mělo dojít i ke zvýšené produkci NO prostřednictvím NOS, což by napomohlo ke zvýšené produkci Def-1 (Foley & O'Farrell, 2003, Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). Nižší obsah Def-1 se nacházel

u imunizovaných včel z kontrolní skupiny krmené SACH a imunizovaných včel ze skupiny krmené L-NAME, kde byla hladina Def-1 přibližně stejná. Tyto stejné hladiny Def-1 nejsou v souladu s předpokladem, že hladina Def-1 by měla být nižší u skupiny krmené s přísadkou L-NAME v porovnání s kontrolní skupinou krmenou SACH, protože L-NAME by měl inhibovat produkci NO prostřednictvím NOS (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). V důsledku nižší hladiny NO, který napomáhá produkci AMP, by měly být oproti kontrole i nižší hladiny Def-1 (Foley & O'Farrell, 2003, Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018), nicméně signalizace NO není jediným regulačním mechanismem pro produkci AMP. U včely medonosné indukují produkci AMP různé imunitní dráhy, a to Toll, IMD-JNK a JAK/STAT (Daníhlík et al., 2016). Zapojení NO do imunitních drah včely medonosné nebylo z tohoto hlediska doposud studováno. Nicméně produkce NO prostřednictvím NOS je indukována Toll a IMD drahami u octomilky obecné (Foley & O'Farrell, 2003) a blyškovky červivcové (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018), u komára *A. gambiae* je produkce NO prostřednictvím NOS indukována STAT drahou (Gupta et al., 2009). Je nutné podotknout, že u některých skupin byly u stanovených hladin Def-1 vysoké hodnoty směrodatných odchylek, což může být způsobeno biologickou variabilitou jednotlivých včel. Pro přesnější data by bylo potřebné experiment provést na větším počtu včel.



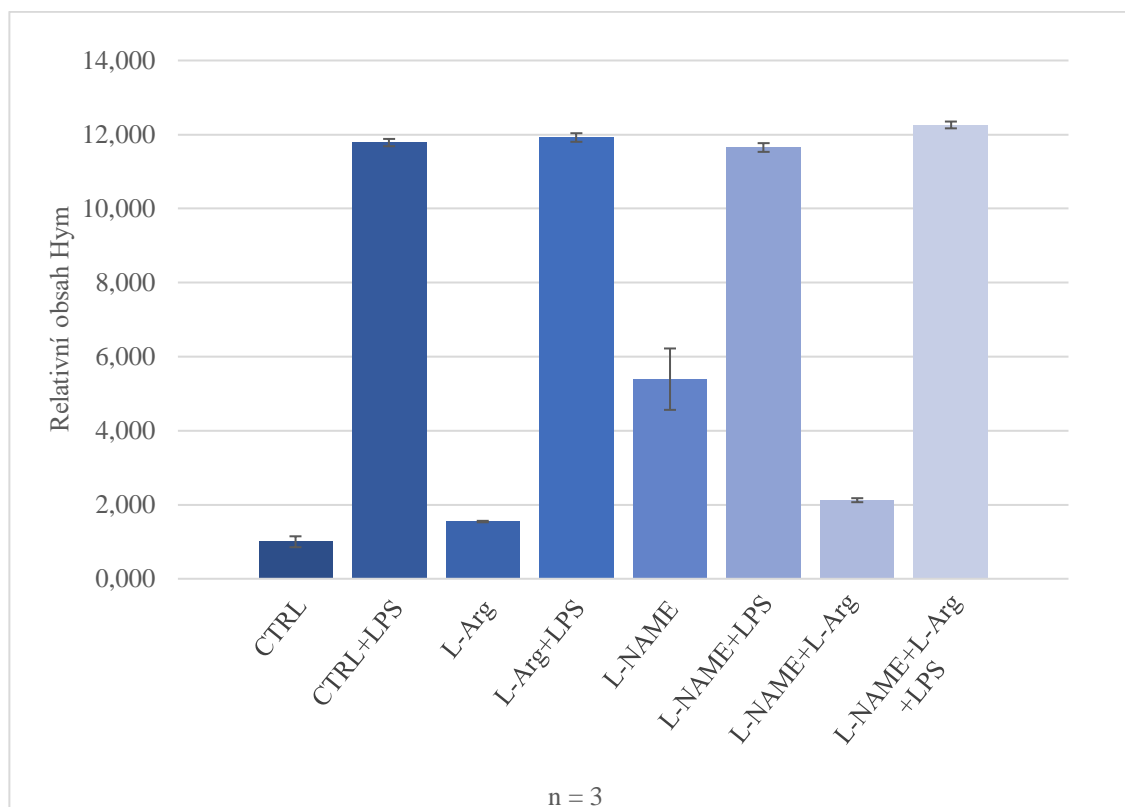


Obr. 7 Relativní obsah Def-1 ve vzorcích hemolymfy imunizovaných a neimunizovaných včel s odlišným krmáním. Hladině Def-1 u kontrolní skupiny byla přiřazena hodnota 1. CTRL = skupina krmená SACH. CTRL + LPS = skupina krmená SACH a imunizovaná LPS. L-Arg = skupina krmená SACH a L-Arg; L-Arg + LPS = skupina krmená SACH a L-Arg a imunizovaná LPS. L-NAME = skupina krmená SACH a L-NAME. L-NAME + LPS = skupina krmená SACH a L-NAME imunizovaná LPS. L-Arg + L-NAME = skupina krmená SACH a L-Arg a L-NAME; L-Arg + L-NAME + LPS = skupina krmená SACH a L-Arg a L-NAME imunizovaná LPS. Stanovení bylo provedeno pro 3 biologické replikáty. Z hodnot obsahu Def-1 byl vypočten aritmetický průměr a SD

V případě Hym (Obr. 8) byly pozorovány nejnižší hladiny Hym neimunizovaných včel všech testovaných skupin. To odpovídá předpokladu, že u včel, kde nedošlo ke stimulaci imunitního systému, nemělo dojít ke zvýšené produkci Hym podobně jako u ostatních AMP. Nejvyšší obsah Hym u neimunizovaných včel byl pozorován u neimunizované skupiny krmené L-NAME, kde byl obsah Hym výrazně vyšší než u zbylých skupin neimunizovaných včel. Nižší obsah Hym byl u neimunizované skupiny krmené L-NAME + L-Arg. Ještě nižší obsah Hym byl stanoven u neimunizované skupiny krmené L-Arg a nejméně Hym obsahovala neimunizovaná kontrolní skupina krmená SACH. U těchto skupin včel se očekávalo, že bude hladina Hym přibližně stejná, protože bez stimulace imunitního systému by nemělo dojít ke zvýšené produkci Hym (Daníhlík et al., 2016). Modulátory hladiny NO (L-Arg, L-NAME) neměly významný vliv na produkci Hym, pouze u neimunizované skupiny krmené s přídatkem L-NAME byly vyšší hladiny Hym oproti neimunizované kontrolní skupině krmené SACH. Zde pravděpodobně došlo k aktivaci produkce Hym jiným mechanismem než prostřednictvím NO, protože v důsledku inhibičního účinku L-NAME na NOS by se měly snížit hladiny NO (Daníhlík et al., 2016, Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). Indukce produkce AMP u včely medonosné je zprostředkována imunitními drahami Toll, IMD-JNK a JAK/STAT (Daníhlík et al., 2016). Zapojení NO do imunitních drah včely medonosné nebylo studováno. Nicméně produkce NO prostřednictvím NOS je indukována Toll a IMD drahami u octomilky obecné (Foley & O'Farrell, 2003) a blyškovky červivcové (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018), u komára *A. gambiae* je produkce NO prostřednictvím NOS indukována STAT drahou (Gupta et al., 2009). Rozdíly v hladinách Hym mohou být také způsobeny biologickou variabilitou jednotlivých včel. Pro eliminaci vlivu biologické variability by bylo potřebné provést experiment na více včelách.

Imunizace vyvolala u všech skupin zvýšenou produkci Hym (Obr. 8), což odpovídá předpokladu, kdy po stimulaci imunitního systému mělo dojít ke zvýšení hladiny Hym (Daníhlík et al., 2016, Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). Obsah Hym ve všech skupinách imunizovaných včel byl přibližně stejný. To může naznačovat, že NO není do procesu regulace produkce Hym významně zapojen. Dále to může znamenat, že použité hladiny modulátorů NO nebyly dostatečné pro ovlivnění produkce Hym. Pro příští experimenty by bylo vhodné otestovat koncentrace hladiny modulátorů NO tak, aby měly vliv na produkci NO, ale nevedly k poškození organismu. U včely medonosné zatím nebyla provedena žádná studie zaměřená na vliv modulátorů hladiny NO na produkci

AMP. U jiných druhů hmyzu, např. u blyskavky červivcové, bylo prokázáno, že zvýšená hladina NO vede ke zvýšení produkce AMP (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018).



Obr. 8 Relativní obsah Hym ve vzorcích hemolymfy imunizovaných a neimunizovaných včel s odlišným krmením. Hladině Hym u kontrolní skupiny byla přiřazena hodnota 1. CTRL = skupina krmená SACH. CTRL + LPS = skupina krmená SACH a imunizovaná LPS. L-Arg = skupina krmená SACH a L-Arg; L-Arg + LPS = skupina krmená SACH a L-Arg a imunizovaná LPS. L-NAME = skupina krmená SACH a L-NAME. L-NAME + LPS = skupina krmená SACH a L-NAME imunizovaná LPS. L-Arg + L-NAME = skupina krmená SACH a L-Arg a L-NAME; L-Arg + L-NAME + LPS = skupina krmená SACH a L-Arg a L-NAME imunizovaná LPS. Stanovení bylo provedeno pro 3 biologické replikáty. Z hodnot obsahu Hym byl vypočten aritmetický průměr a SD

AMP, který se u zkoumaných včel vyskytoval v nejvyšším množství, byl Hym (Obr. 8). Nižší hladiny byly pozorovány u Aba (Obr. 6) a nejnižší hladiny byly zaznamenány u Def-1 (Obr. 7). Tyto výsledky splňují předpoklad, že po imunizaci lipopolysacharidy z *E. coli* dochází u hostitele především k stimulaci produkce Hym (Jefferson et al., 2013, Danihlík et al., 2016).

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že za zvolených podmínek neměly modulátory hladin NO (ovlivněním aktivity NOSynthasy) příliš vliv na produkci zkoumaných AMP. U včely medonosné nebyla dosud provedena žádná studie zaměřená na vliv hladin NO na produkci AMP. U jiných druhů hmyzu je známo, že vyšší hladina NO vede k vyšší produkci AMP. Např. u blyškavky červivcové (Sadekuzzaman & Kim, Ling, 2018). Dá se tedy předpokládat, že i u včely medonosné bude buněčná hladina NO ovlivňovat produkci AMP. Pro příští studie by bylo vhodné otestovat vliv dalšího navýšení hladin daných modulátorů NO v rámci krmicích experimentů včel a rovněž by bylo potřebné provést experimenty ve více replikátech pro získání přesnějších dat.

## 5 ZÁVĚR

V rámci teoretické části bakalářské práce byla zpracována literární rešerše, ve které byla shrnuta obecná charakteristika NO a RNS v živých organismech, a jejich úloha v rámci imunitního systému hmyzu. Dále byly shrnuty známé poznatky o funkcích NO u včely medonosné, byl charakterizován imunitní systém včely medonosné a byly shrnuty poznatky o AMP včely medonosné.

V praktické části bakalářské práce byla ve včelích extraktech ze včel krmených modulatory hladiny NO Savillovou metodou stanovena hladina RSNO vztažená na 1 mg proteinů. Hladiny RSNO ve včelích extraktech se významně nelišily. Dále byla v hemolymfě včel krmených modulatory hladiny NO stanovena hladina vybraných AMP (Aba, Def-1, Hym) v relativním vztažení ke kontrolní skupině krmené SACH. Ke stanovení vybraných AMP byla použita nepřímá ELISA. Imunizace lipopolysacharidy z *E. coli* prokazatelně zvýšila produkci všech tří stanovovaných AMP. Modulatory hladiny NO příliš neovlivňovaly produkci AMP.

Přímá souvislost mezi zvýšenou produkcí AMP a zvýšenou koncentrací NO v organismu včely nebyla v rámci této bakalářské práce prokázána, proto je zapotřebí provést další experimenty k řešené problematice. Pro příští experimenty by bylo vhodné otestovat hladiny L-Arg a L-NAME, které by měly dopad na intracelulární hladiny zásobních forem NO a zároveň by nezatěžovaly organismus. Rovněž by bylo vhodné stanovit přímo hladiny NO a nejen jeho zásobních forem, RSNO, dále také množství jeho dalších metabolitů, tedy dusitanů a dusičnanů, protože by tato data poskytla komplexnější pohled na celkovou hladinu NO v organismu než pouhé stanovení RSNO.

## 6 LITERATURA

- Adams, L., Franco, M. C., & Estevez, A. G. (2015). Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Experimental Biology and Medicine*, 240(6), 711-717. <https://doi.org/10.1177/1535370215581314>
- Aluko, E. O., Olubobokun, T. H., Atang, D. E., & Nna, V. U. (2014). Honey's Ability to Reduce Blood Pressure and Heart Rate in Healthy Male Subjects. *Frontiers in Science*, 4(1), 8-11. <https://doi.org/10.5923/j.fs.20140401.02>
- Bahadır, A., Kurucu, N., Kadioğlu, M., & Yenilmez, E. (2014). The Role of Nitric Oxide in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: Experimental Study. *Turkish Journal of Hematology*, 31(1). <https://doi.org/10.4274/Tjh.2013.0013>
- Bergmann, S., Gerhards, J. -P., Schmitz, A., Becker, S. C., & Stern, M. (2021). NO Synthesis in Immune-Challenged Locust Hemocytes and Potential Signaling to the CNS. *Insects*, 12(10), 1-25. <https://doi.org/10.3390/insects12100951>
- Bicker, G. (2001). Nitric oxide: An unconventional messenger in the nervous system of an orthopteroid insect. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 48(2), 100-110. <https://doi.org/10.1002/arch.1062>
- Bogdan, C., Andersen, K., Thuesen, A. D., Shin, H. -S., Vanhoutte, P. M., Skøtt, O., Jensen, B. L., Hill, C., & Hansen, P. B. L. (2015). Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in Immunology*, 36(3), 161-178. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.01.003>
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Broniowska, K. A., Keszler, A., Basu, S., Kim-Shapiro, D. B., & Hogg, N. (2012). Cytochrome c -mediated formation of S -nitrosothiol in cells. *Biochemical Journal*, 442(1), 191-197. <https://doi.org/10.1042/BJ20111294>
- Broniowska, K. A., Diers, A. R., & Hogg, N. (2013). S-Nitrosoglutathione. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3173-3181. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.004>
- Bryan, N. S. (2006). Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence?. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(5), 691-701. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.019>
- da Silva, R., da Silva, S. R., & Lange, A. B. (2012). The regulation of cardiac activity by nitric oxide (NO) in the Vietnamese stick insect, *Baculum extradentatum*. *Cellular Signalling*, 24(6), 1344-1350. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.010>
- Danihlík, J. (2011). *Analýza parametrů humorální imunity včel* [Diplomová práce]. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Danihlík, J., Aronstein, K., & Petřivalský, M. (2016). Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*, 54(2), 123-136. <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>
- Davies, S. -A. (2000). Nitric oxide signalling in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(30), 1123-1138.
- Davies, S. -A. (2007). Nitric oxide signalling in insect epithelial transport. *Nitric Oxide*, 1(1), 83-455. [https://doi.org/10.1016/S1872-2423\(07\)01004-6](https://doi.org/10.1016/S1872-2423(07)01004-6)
- Davies, S. -A., & Dow, J. A. T. (2009). Modulation of epithelial innate immunity by autocrine production of nitric oxide. *General and Comparative Endocrinology*, 162(1), 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.09.012>
- Davis, R. L. (2011). Traces of *Drosophila* Memory. *Neuron*, 70(1), 8-19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.012>

- Drake, M. G., Bivins-Smith, E. R., Proskocil, B. J., Nie, Z., Scott, G. D., Lee, J. J., Lee, N. A., Fryer, A. D., & Jacoby, D. B. (2016). Human and Mouse Eosinophils Have Antiviral Activity against Parainfluenza Virus. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 55(3), 387-394. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0405OC>
- Drechsel, D. A., Estévez, A. G., Barbeito, L., & Beckman, J. S. (2012). Nitric Oxide-Mediated Oxidative Damage and the Progressive Demise of Motor Neurons in ALS. *Neurotoxicity Research*, 22(4), 251-264. <https://doi.org/10.1007/s12640-012-9322-y>
- Dubovskiy, I. M., Kryukova, N. A., Glupov, V. V., & Ratcliffe, N. A. (2016). Encapsulation and nodulation in insects. *ISJ-Invertebrate Survival Journal*, 13(1), 229-246. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v13i1.229-246>
- Ellison, H. E., Estévez-Lao, T. Y., Murphree, C. S., & Hillyer, J. F. (2015). Deprivation of both sucrose and water reduces the mosquito heart contraction rate while increasing the expression of nitric oxide synthase. *Journal of Insect Physiology*, 74, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.01.011>
- Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J. -L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G. J., Zou, Z., & Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 645-656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>
- Faghihi, F., Moustafa, A. A., Heinrich, R., & Wörgötter, F. (2017). A computational model of conditioning inspired by *Drosophila* olfactory system. *Neural Networks*, (vol. 87), 96-108. <https://doi.org/10.1016/j.neunet.2016.11.002>
- Fang, F. C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10), 820-832. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1004>
- Foley, E., & O'Farrell, P. H. (2003). Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes & Development*, 17(1), 115-125. <https://doi.org/10.1101/gad.1018503>
- Gladwin, M. T., Schechter, A. N., Kim-Shapiro, D. B., Patel, R. P., Hogg, N., Shiva, S., Cannon, R. O., Kelm, M., Wink, D. A., Espey, M. G., Oldfield, E. H., Pluta, R. M., Freeman, B. A., Lancaster, J. R., Feelisch, M., & Lundberg, J. O. (2005). The emerging biology of the nitrite anion. *Nature Chemical Biology*, 1(6), 308-314. <https://doi.org/10.1038/nchembio1105-308>
- Gupta, L., Molina-Cruz, A., Kumar, S., Rodrigues, J., Dixit, R., Zamora, R. E., & Barillas-Mury, C. (2009). The STAT Pathway Mediates Late-Phase Immunity against *Plasmodium* in the Mosquito *Anopheles gambiae*. *Cell Host & Microbe*, 5(5), 498-507. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.003>
- Herrera-Ortiz, A., Martínez-Barnette, J., Smit, N., Rodriguez, M. H., & Lanz-Mendoza, H. (2011). The effect of nitric oxide and hydrogen peroxide in the activation of the systemic immune response of *Anopheles albimanus* infected with *Plasmodium berghei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(1), 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.08.004>
- Hughes, M. N. (2008). Chemistry of Nitric Oxide and Related Species. *Globins and Other Nitric Oxide-Reactive Proteins, Part A*, 3-19. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)36001-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)36001-7)
- Hyršl, P. (2018). Imunita hmyzu a dalších bezobratlých živočichů 1. *Živa*, (1), 32-34.
- Imler, J. -L., & Bulet, P. (2005). Antimicrobial Peptides in *Drosophila*: Structures, Activities and Gene Regulation. *Mechanisms of Epithelial Defense*, (86), 1-21. <https://doi.org/10.1159/000086648>
- Ito, C., Saito, Y., Nozawa, T., Fujii, S., Sawa, T., Inoue, H., Matsunaga, T., Khan, S., Akashi, S., Hashimoto, R., Aikawa, C., Takahashi, E., Sagara, H., Komatsu, M.,

- Tanaka, K., Akaike, T., Nakagawa, I., & Arimoto, H. (2013). Endogenous Nitrated Nucleotide Is a Key Mediator of Autophagy and Innate Defense against Bacteria. *Molecular Cell*, *52*(6), 794-804. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.024>
- J. D. Wright, N. (2019). A review of the actions of Nitric Oxide in development and neuronal function in major invertebrate model systems. *AIMS Neuroscience*, *6*(3), 146-174. <https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2019.3.146>
- Jahnová, J., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2019). S-Nitrosoglutathione Reductase—The Master Regulator of Protein S-Nitrosation in Plant NO Signaling. *Plants*, *8*(2), 1-19. <https://doi.org/10.3390/plants8020048>
- Jahnová, J., Tichá, T., Kubienová, L., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2013). Biologické funkce a význam S-nitrosace proteinů. *Chemické listy*, *107*(5), 350–355.
- Jefferson, J. M., Dolstad, H. A., Sivalingam, M. D., Snow, J. W., & Amdam, G. V. (2013). Barrier Immune Effectors Are Maintained during Transition from Nurse to Forager in the Honey Bee. *PLoS ONE*, *8*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054097>
- Kim, J., Saravanakumar, G., Choi, H. W., Park, D., & Kim, W. J. (2014). A platform for nitric oxide delivery. *J. Mater. Chem. B*, *2*(4), 341-356. <https://doi.org/10.1039/C3TB21259A>
- Korde Choudhari, S., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadbail, A. R., & Joshi, V. (2013). Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-118>
- Kozlov, A., Koch, R., & Nagoshi, E. (2020). Nitric oxide mediates neuro-glia interaction that shapes *Drosophila* circadian behavior. *PLoS Genet*, *16*(6), 1-21. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008312>
- Kurylas, A. E., Ott, S. R., Schachtner, J., Elphick, M. R., Williams, L., & Homberg, U. (2005). Localization of nitric oxide synthase in the central complex and surrounding midbrain neuropils of the locust *Schistocerca gregaria*. *The Journal of Comparative Neurology*, *484*(2), 206-223. <https://doi.org/10.1002/cne.20467>
- Le Conte, Y., Alaux, C., Martin, J. -F., Harbo, J. R., Harris, J. W., Dantec, C., Séverac, D., Cros-Arteil, S., & Navajas, M. (2011). Social immunity in honeybees (*Apis mellifera*): transcriptome analysis of varroa-hygienic behaviour. *Insect Molecular Biology*, *20*(3), 399-408. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01074.x>
- Liu, W., Wang, Y., Leng, Z., Wang, Q., Duan, X., Luo, Y., Jiang, Y., & Qin, L. (2020). Nitric oxide plays a crucial role in midgut immunity under microsporidian infection in *Antheraea pernyi*. *Molecular Immunology*, *126*, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.07.018>
- Lundberg, J. O., & Weitzberg, E. (2010). NO-synthase independent NO generation in mammals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *396*(1), 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.136>
- Matsumoto, Y., Hatano, A., Unoki, S., & Mizunami, M. (2009). Stimulation of the cAMP system by the nitric oxide-cGMP system underlying the formation of long-term memory in an insect. *Neuroscience Letters*, *467*(2), 81-85. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.10.008>
- Matsumoto, Y., Hirashima, D., Terao, K., Mizunami, M., & Roman, G. (2013). Roles of NO Signaling in Long-Term Memory Formation in Visual Learning in an Insect. *PLoS ONE*, *8*(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068538>
- Mizunami, M., & Matsumoto, Y. (2017). Learning and Memory. In H. Horch, T. Mito, A. Popadić, H. Ohuchi, & S. Noji, *The Cricket as a Model Organism: Development, Regeneration, and Behavior* (pp. 129–140). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-56478-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-4-431-56478-2_9)



- Mizunami, M., Hamanaka, Y., & Nishino, H. (2015). Toward elucidating diversity of neural mechanisms underlying insect learning. *Zoological Letters*, *1*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40851-014-0008-6>
- Nazario-Toole, A. E., & Wu, L. P. (2017). Phagocytosis in Insect Immunity. *Insect Immunity*, (52), 35-82. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2016.12.001>
- Negri, P., Maggi, M., Correa-Aragunde, N., Brasesco, C., Eguaras, M., & Lamattina, L. (2013). Nitric oxide participates at the first steps of *Apis mellifera* cellular immune activation in response to non-self recognition. *Apidologie*, *44*(5), 575-585. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0207-8>
- Negri, P., Maggi, M., Ramirez, L., Szawarski, N., De Feudis, L., Lamattina, L., & Eguaras, M. (2016). Cellular immunity in *Apis mellifera*: studying hemocytes brings light about bees skills to confront threats. *Apidologie*, *47*(3), 379-388. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0418-2>
- Negri, P., Quintana, S., Maggi, M., Szawarski, N., Lamattina, L., & Eguaras, M. (2014). *Apis mellifera* hemocytes generate increased amounts of nitric oxide in response to wounding/encapsulation. *Apidologie*, *45*(5), 610-617. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0279-0>
- Picón-Pagès, P., Garcia-Buendia, J., & Muñoz, F. J. (2019). Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1865*(8), 1949-1967. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.11.007>
- Porrini, C., Ramarao, N., & Tran, S. -L. (2020). Dr. NO and Mr. Toxic – the versatile role of nitric oxide. *Biological Chemistry*, *401*(5), 547-572. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0368>
- Radi, R. (2013). Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of Functional Effects. *Accounts of Chemical Research*, *46*(2), 550-559. <https://doi.org/10.1021/ar300234c>
- Regehr, W. G., Carey, M. R., & Best, A. R. (2009). Activity-Dependent Regulation of Synapses by Retrograde Messengers. *Neuron*, *63*(2), 154-170. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.021>
- Sadekuzzaman, M., & Kim, Y., Ling, E. (Ed.). (2018). Nitric oxide mediates antimicrobial peptide gene expression by activating eicosanoid signaling. *PLOS ONE*, *13*(2), 1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193282>
- Sanzhaeva, U., Vorontsova, Y., Glazachev, Y., & Slepneva, I. (2016). Dual effect of nitric oxide on phenoloxidase-mediated melanization. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *31*(6), 1063-1068. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1088843>
- Sfara, V., Zerba, E. N., & Alzogaray, R. A. (2011). Deterrence of feeding in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) after treatment of antennae with a nitric oxide donor. *European Journal of Entomology*, (108), 701-704.
- Stern, M., & Bicker, G. (2010). Nitric oxide as a regulator of neuronal motility and regeneration in the locust embryo. *Journal of Insect Physiology*, *56*(8), 958-965. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.03.031>
- Thibeault, S., Rautureau, Y., Oubaha, M., Faubert, D., Wilkes, B. C., Delisle, C., & Gratton, J. -P. (2010). S-Nitrosylation of  $\beta$ -Catenin by eNOS-Derived NO Promotes VEGF-Induced Endothelial Cell Permeability. *Molecular Cell*, *39*(3), 468-476. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.013>
- Tiwari, M., Prasad, S., Pandey, A. N., Premkumar, K. V., Tripathi, A., Gupta, A., Chetan, D. R., Yadav, P. K., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2017). Nitric oxide signaling during meiotic cell cycle regulation in mammalian oocytes. *Frontiers In Bioscience*, *1*(9), 307-31.

- Watanabe, T., Kikuchi, M., Hatakeyama, D., Shiga, T., Yamamoto, T., Aonuma, H., Takahata, M., Suzuki, N., & Ito, E. (2007). Gaseous neuromodulator-related genes expressed in the brain of honeybee *Apis mellifera*. *Developmental Neurobiology*, 67(4), 456-473. <https://doi.org/10.1002/dneu.20359>
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D. F., & Durner, J. (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science*, 6(4), 177-183. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01893-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01893-3)
- Wilson, C. H., Christensen, T. A., & Nighorn, A. J. (2007). Inhibition of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase signaling affects olfactory neuron activity in the moth, *Manduca sexta*. *Journal of Comparative Physiology A*, 193(7), 715-728. <https://doi.org/10.1007/s00359-007-0227-9>
- Yabuki, M., Tsutsui, K., Horton, A. A., Yoshioka, T., & Utsumi, K. (2009). Caspase activation and cytochrome c release during HL-60 cell apoptosis induced by a nitric oxide donor. *Free Radical Research*, 32(6), 507-514. <https://doi.org/10.1080/10715760000300511>
- Zhang, Z., Naughton, D., Winyard, P. G., Benjamin, N., Blake, D. R., & Symons, M. C. R. (1998). Generation of Nitric Oxide by a Nitrite Reductase Activity of Xanthine Oxidase: A Potential Pathway for Nitric Oxide Formation in the Absence of Nitric Oxide Synthase Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249(3), 767-772. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9226>

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

8-nitro-cGMP	8-nitro-cyklický adenosinmonofosfát
Aba	abaecin
AC	adenylátcyklasa
AMP	antimikrobiální peptidy
CaM	komplex $\text{Ca}^{2+}$ iontů s kalmodulinem
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanoseninmonofosfát
COX	cyklooxygenasy
CREB	transkripční faktor citlivý na cAMP
CuZnSOD	CuZn superoxiddismutasy
Def-1	defensin-1
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	DL-Dithiothreitol
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
eNOS	endoteliální NOS
G <sup>-</sup>	gramnegativní
G <sup>+</sup>	grampozitivní
GPx	glutathionperoxidasa
GSH	glutathion
GSHR	GSHreduktasa
GSNHOH	S-hydroxylaminoglutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSONH <sub>2</sub>	glutathionsulfinamid

GSSG	disulfid glutathionu
GSSOH	sulfinová kyselina odvozená od glutathionu
GTP	guanosintrifosfátu
Hym	hymenoptaecin
iNOS	inducibilní NOS
L-AT	aminokyselinový transportní L systém
L-NAME	N- $\omega$ -nitro-L-argininmethylesterhydrochlorid; kompetitivní inhibitor NOS
LOX	lipoxygenasy
LPS	lipopolysacharidy
LTM	dlouhodobá paměť
MTM	střednědobá paměť
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
nNOS	neuronální NOS
NO	oxid dusnatý
NOS	NOsynthasa
ONOO <sup>-</sup>	peroxydusitan
PAK	cAMP-proteinkinasa A
PKG	proteinkinasa G
PLA 2	fosfolipasa A2
RNR	ribonukleotidreduktasa
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RS <sup>-</sup>	thiolátový aniont
RSNO	S-nitrosothioly

SACH	sacharosa
sGC	solubilní guanylátcyklasa
-SH	thiolová skupina
STM	krátkodobá paměť
TMB	3, 3',5,5'-tetramethylbenzidin
XO	xantinoxidasa